

**WIRKUNG VON NICLOSAMID , NICLOFOLAN ,
PRAZIQUANTEL UND TRICLABENDAZOL ,
EINSCHLIESSLICH SEINER SULPHON-
UND SULFOXIDMETABOLITEN AUF
ADULTE FASCIOLA HEPATICA
IN VITRO**

AXEL M . GRUNEWALD

1987

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
der Universität München

Vorstand der Abteilung:

Professor Dr.med.W.Lang

Wirkung von Niclosamid, Niclofolan, Praziquantel
und Triclabendazol, einschließlich seiner Sulphon-
und Sulfoxidmetaboliten auf adulte *Fasciola hepatica*
in vitro

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Axel M.Grunewald

aus

Hofheim / Taunus

Jahr

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.W.Lang

Mitberichterstatter: Prof.Dr.E.Buchborn

Prof.Dr.G.Ruckdeschel

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr.Th.Loeschner

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.87

Herrn Professor Dr. med. W. Lang danke ich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit unter besten Bedingungen.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. med. Th. Löscher für seine fundierte wissenschaftliche Anleitung und stete Hilfsbereitschaft während jeder Phase der Entstehung dieser Studie danken.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Frl. Elisabeth Nägele, Herrn M. Reimann und den Mitarbeitern des Instituts für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, die mir ihre unablässige Hilfe und Unterstützung gewährt haben.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	3
2. Problemstellung und Zielsetzung	7
3. Material und Methodik	9
3.1 Fasciola hepatica Adultwürmer	9
3.2 Arbeitsplatz	9
3.3 Medien	9
3.4 Medikamente	10
3.5 Kulturgefäße	11
3.6 Beobachtungsmethodik	11
4. Ergebnisse	12
4.1 Voruntersuchungen	12
4.1.1 Kulturmethodik	12
4.1.1.1 Medien	12
4.1.1.2 Gasaustausch	12
4.1.2 Penicillin / Streptomycin	13
4.1.3 Lösungsmittel	13
4.1.4 Eiausscheidung	14
4.2 Medikamentenuntersuchung	24
4.2.1 Niclofolan	24
4.2.2 Niclosamid	24
4.2.3 Praziquantel	24
4.2.4 Triclabendazol	25
4.2.5 Triclabendazol-Sulfoxidmetabolit	27
4.2.6 Triclabendazol-Sulphonmetabolit	28

	Seite
5. Diskussion	43
5.1 Zuverlässigkeit und Aussagekraft der Untersuchungen	43
5.1.1 Gewinnungsmethode	43
5.1.2 Medium	43
5.1.3 Antibiotischer Zusatz	44
5.1.4 Lösungsmittel	44
5.1.5 Beobachtungsmethoden	45
5.1.6 Medikamente	46
5.2 Vergleich mit anderen Untersuchungen	47
5.2.1 Methodik	47
5.2.2 Medikamentenwirkung	48
5.3 Schlußfolgerungen	51
6. Zusammenfassung	52
7. Literaturverzeichnis	53
Lebenslauf	59

1. EINLEITUNG

In der Veterinärmedizin stehen seit langem mehrere wirksame Faszioleaze zur Verfügung. Am häufigsten angewandt werden Wirkstoffe aus der Gruppe der Salicylanilide (z.B. Rafoxanid und Oxcyclozanid). Weitere bewährte Faszioleaze gehören den Wirkstoffgruppen der Nitrophenole (z.B. Niclofolan), der Chlorphenole (z.B. Bithionol), der Organophosphate (z.B. Mctrifonat, Dichlorvos) und der Acetophenitidine (z.B. Diamfenetid) an. (26)

Bei der menschlichen Faszioleaze haben die in der Veterinärmedizin verwendeten Medikamente jedoch keine Bedeutung erlangt. Ursachen hierfür sind:

- geringe Resorption im Gastrointestinaltrakt,
- geringe Ausscheidung über die Gallenwege,
- schmale, therapeutische Breite und
- Toxizität.

Zur Therapie der Faszioleaze beim Menschen werden daher noch vorwiegend Emetin bzw. Dehydroemetin und/oder Chloroquin angewandt. Bei den erforderlichen Dosierungen ist jedoch ebenfalls mit Nebenwirkungen zu rechnen. Zudem sind diese Faszioleaze nicht zuverlässig wirksam; eine vollständige parasitologische Heilung ist oft erst nach wiederholter Behandlung zu erreichen.

Zwei neue Medikamente fanden in der letzten Zeit besonderes Interesse bei der Behandlung der Faszioleaze:

Praziquantel, ein Breitbandanthelmintikum, das seit Mai 1980 in der Humanmedizin unter den Namen Biltricid^R (Bayer AG) und Cesol^R (E. Merck) zugelassen ist, und

Triclabendazol, ein Faszioleazid, das bislang nur in der Veterinärmedizin angewandt wird und dort unter dem Namen Fasinex^R (Ciba-Geigy) seit 1983 im Handel ist.

PRAZIQUANTEL (2-cyclohexylcarbonyl-1,2,3,6,11b hexahydro-2H-pyrazino-(2,1a)isoquinolone-4-one), ein acetyliertes Isochinolinpyrazinon-derivat, ist eine farblose, kristalline Substanz von bitterem Geschmack. (21)

Praziquantel wird rasch und zu über 80 % enteral resorbiert. (34)
1-2 Stunden nach der Einnahme ist das Maximum im Serum erreicht. (30)
Studien mit C14 markiertem Praziquantel zeigten einen ausgeprägten first-pass Effekt und eine Halbwertszeit von 1-1,5 Stunden. (30)
Nach 8 Stunden fallen bereits weniger als 0,1 % der gemessenen Gesamtradioaktivität im Serum auf die unveränderte Ausgangssubstanz Praziquantel. (10)
Über 70 % der Gesamtradioaktivität wird nach 24 Stunden über die Niere, den Harnausscheidungsweg, eliminiert. (34)
Praziquantel ist dabei durch den raschen Metabolismus nur noch in Spuren in Urin und Faeces nachweisbar. (3)

Praziquantel zeigt eine anthelmintische Wirkung gegen folgende Zestoden und Trematoden:

<i>Taenia solium</i> (Adulte und Larvengewebe)	(9) (23) (39)
<i>Taenia saginata</i> (Adulte)	(23)
<i>Diphyllobotrium latum</i> (Adulte)	(4) (12) (23)
<i>Hymenolepis nana</i> (Adulte und Zystizerkoide)	(19) (23) (41)
<i>Schistosoma mansoni</i> , <i>haematobium</i> , <i>japonicum</i> , <i>intercalatum</i> und <i>mekongi</i>	(8)
<i>Fasciolopsis buski</i>	(11)
<i>Clonorchis sinensis</i>	(31) (38)
<i>Opisthorchis viverrini</i>	(2)
<i>Opisthorchis felineus</i>	(31)
<i>Paragonimus westermani</i>	(37)

Praziquantel zeichnet sich durch gute Verträglichkeit und nur geringe Nebenwirkungen aus.

Beobachtete Nebenwirkungen sind:

Oberbauchschmerzen und Diarrhoe, seltene Kopfschmerzen, Nausea, Erbrechen, Vertigo und Urtikaria. (4) (22) (35)

Als einzige gravierende Nebenwirkung wurden bei 3 Patienten mit Zystizerkose epileptische Anfälle unter Behandlung mit Praziquantel beobachtet, die möglicherweise durch die Abtötung des Parasitengewebes mit Freisetzung von Antigenen bedingt sind. (13) (43) (49)

Sämtliche Nebenwirkungen verschwanden nach Absetzen des Medikamentes nach maximal 24 Stunden und waren vollständig reversibel. (22)
Biochemische und hämatologische Parameter zeigten in zahlreichen Studien keine pathologischen Veränderungen während oder nach der Behandlung. (1) (2) (5) (22) (35) (40)

Praziquantel zeigte in bisherigen Untersuchungen beim Menschen und beim Tier eine unzuverlässige Wirkung auf *Fasciola hepatica*. (32) (46)
Eine prospektive Studie an 34 Patienten mit Fasciolose ergab ein Sistieren der Eiausscheidung nach Therapie bei nur 21 % der Patienten. (27)

TRICLABENDAZOL ist ein neues Anthelmintikum aus der Gruppe der Benzimidazole.

Bei Versuchen an Schafen und Rindern zeigte sich eine besonders gute und zuverlässige Wirkung auf die Fasziole.

Im Gegensatz zu anderen Benzimidazolen wirkt Triclabendazol nicht bei Nematoden. (14)

Fehlen der nematoziden Wirkung einerseits und die gering fasciolizide Wirkung anderer Benzimidazole andererseits, machen eine von den anderen Benzimidazolen abweichende Reaktionsweise des Triclabendazols wahrscheinlich. (14)

Genaue Kenntnisse über die Reaktionsweise liegen noch nicht vor (Richards, persönliche Mitteilung).

Das in Reinsubstanz weiß kristalline Triclabendazol ist ein 6-chloro-5-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methyl-thiobenzimidazol.

Triclabendazol wird bei Schafen und Ziegen rasch und zu ca. 65 % enteral resorbiert, 24-36 Stunden nach oraler Einnahme ist das Maximum im Serum erreicht. (14)

Studien mit radioaktivem C14-Triclabendazol zeigten einen first-pass Effekt und eine biologische Halbwertszeit von 22-24 Stunden im Tier. (14) (25)

Triclabendazol wird in der Leber zu Sulfoxid und Sulphon oxidiert. (14) (25)

Über 95 % der Gesamtradioaktivität wird bei einer Beobachtungszeit von 10 Tagen über die Gallenwege ausgeschieden, 2 % im Urin. (14)

Triclabendazol teilt mit den anderen Benzimidazolen die besonders gute Verträglichkeit. Bei vergleichenden Versuchen mit dem Faszioлизid Niclofolan ergab sich nicht nur eine bessere Verträglichkeit (Niclofolan verursachte Toxizitätserscheinungen bei Versuchen mit infizierten Schafen, Triclabendazol blieb dagegen nebenwirkungsfrei), sondern auch eine bessere fasciolizide Wirkung von Triclabendazol (einmalige Gabe von 10 mg/kg Triclabendazol führte in mehreren Versuchen bei Schafen in allen Fällen zu einer 100 %igen parasitologischen Heilung). (48)

Im Gegensatz zu anderen Faszioлизiden, wie z.B. Rafoxanid, zeigt Triclabendazol zusätzlich eine hohe Wirksamkeit gegen juvenile Fasciola hepatica. (42)

2. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Wie bereits ausgeführt, sind die therapeutischen Möglichkeiten bei der Fascioliasis des Menschen derzeit noch unbefriedigend. Die bisher angewandten Medikamente sind entweder ungenügend wirksam oder mit erheblichen Nebenwirkungen belastet.

Praziquantel, ein neuartiges Anthelmintikum mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen zahlreiche Trematoden, zeigte experimentell weder in vitro noch in vivo eine signifikante Wirkung auf *Fasciola hepatica*. Dennoch konnte bei einigen Fascioliasis-Patienten eine parasitologische Heilung mit Praziquantel erreicht werden, allerdings bei Anwendung ungewöhnlich hoher und langfristiger Dosierung (32, 46).

Triclabendazol, ein neues Benzimidazolderivat mit außerordentlich hoher Wirksamkeit gegen adulte wie juvenile *Fasciola hepatica* ist bei ausgezeichneter Verträglichkeit und günstiger Pharmakokinetik in der Veterinärmedizin bereits ein Faszioizid der ersten Wahl. Eine therapeutische Anwendung beim Menschen ist bisher nicht erfolgt. Erste Untersuchungen zeigen, daß Triclabendazol auch beim Menschen rasch zu Sulfoxid und Sulphon metabolisiert wird (Büscher, persönliche Mitteilung).

Für eine weitere Prüfung von Praziquantel und Triclabendazol zur Therapie der Fascioliasis des Menschen ergeben sich daher zunächst folgende Fragestellungen:

1. Zeigt Praziquantel in vitro eine faszioizide Wirkung bei langdauernder Einwirkung und/oder in hohen Konzentrationen?
2. Bestehen Unterschiede zwischen Triclabendazol und seinen hauptsächlichsten Metaboliten (Sulfoxid und Sulphon) hinsichtlich Art und Ausmaß der faszioiziden Wirkung in vitro?
3. Wird die Wirkung von Faszioiziden in definierten Medien durch Eiweiß- oder Serumzugabe verändert?

Zur Klärung dieser Fragen sollte

- zunächst ein Kulturverfahren mit definiertem Medium entwickelt werden, das eine Kultivierung von *Fasciola hepatica* Adultwürmern mit Erhaltung von Vitalität, Motilität und Fertilität über einen möglichst langen Zeitraum erlaubt,
- die Auswirkung verschiedener Kulturzusätze wie Antibiotika und Lösungsvermittler für Faszioizide untersucht werden,
- die Wirkung von Praziquantel und Triclabendazol einschließlich seiner Metaboliten (Sulfoxid, Sulphon) auf *Fasciola hepatica* in vitro in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von mindestens 8 Tagen untersucht werden und mit 2 Referenzfaszioiziden (Niclofolan, Niclosamid) mit bekannter und schneller Wirksamkeit in vitro verglichen werden,

- der Einfluß von Eiweiß- und Serumzugabe auf die Wirkung der untersuchten Fasziolizide geprüft werden.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1 *Fasciola hepatica* Adultwürmer

Zwischen Januar und Oktober 1984 wurden *Fasciola hepatica* Adultwürmer im städtischen Schlachthof München von befallenen Kuhbeständen entnommen.

Die Leber befallener Kühe wurde mit alkoholhaltigen Desinfektionsmitteln desinfiziert und nach einminütiger Einwirkungszeit mit einem sterilen Einmalskalpell angeschnitten. Mit Hilfe einer sterilen Einmalpinzette wurden bis 50 Trematoden in ein 260 ml-Gefäß (Nunc, Nunclon^R, 153732) mit 37°C warmen Medium M199 und 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin (siehe unten) eingebracht und in einem Styropor-Behälter mit wärmespeichernden Flüssigkeitsakkus in das Labor transportiert.

3.2 Arbeitsplatz

Alle Arbeiten wurden an einer Sterilbank mit horizontalem Laminarstrom durchgeführt. Die Kulturgefäße mit den *Fasciola hepatica* Würmern wurden in einem Brutschrank bei 37°C gelagert.

3.3 Medien

Herstellung der Hedon-Fleish-Lösung

Die verwendete Hedon-Fleish-Lösung wurde aus folgenden Substanzen hergestellt:

NaCl	7,0 g	
KCL	0,3 g	
CaCl	0,1 g	
Glucose	1,0 g	
NaHCO ₃	2,0 g	
Na ₂ HPO ₄	0,5 g	
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,61 g	= MgSO ₄ (wasserfrei) 0,3 g

in Aqua bidest gelöst und aufgefüllt auf 1 Liter. (16)

Herstellung des Mediums M199

Für die Herstellung von 1 l Medium wurden 9,9 g der Trockensubstanz M 199 mit Earle's Salzen (seromed^R, instamed^R, T061-1) verwendet.

1 g Glucose und 2,2 g NaHCO₃ wurden hinzugefügt.

In Aqua bidest wurde gelöst und bis auf 1 l aufgefüllt.

Für ergänzende Untersuchungen mit Triclabendazol und seinen Metaboliten wurde vor dem Auffüllen mit Aqua bidest auf 1 l noch 60 g Albumin hinzugegeben (Biomol 01400 - Albumin aus Rinderserum, Fraktion V, Albumin 99,8 %). Es entstand somit eine 6 g / dl Albumin Lösung.

Für ergänzende Untersuchungen mit Praziquantel wurde vor dem Auffüllen auf 1 l 100 ml Serum der Blutgruppe A Rh+ eines gesunden Spenders hinzugefügt. Es entstand somit eine 10%ige Serum-Lösung.

Sämtliche hergestellten Medien wurden anschließend durch eine Membran mit 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert. Zum Schutz gegen Kontamination erhielten die Medien jeweils 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin. Um einen möglichen Einfluß des Antibiotika-Zusatzes auf die Mortalität der Fasciola hepatica Würmer erkennen zu können, wurde ein Vorversuch mit je 20 Wurmern im Medium M199 mit und ohne 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin-Zusatz durchgeführt.

3.4 **Medikamente**

Getestet wurden:

Niclofolan
Niclosamid
Praziquantel
Triclabendazol, sowie dessen beide Metaboliten:
 Sulfoxid (CGA 110'752)
 Sulphon (CGA 110'753)

Alle Faszioлизide wurden in Äthanol gelöst, mehrere Konzentrationsstufen hergestellt und jeweils 2 ml der erhaltenen alkoholischen Lösung auf 1 l des Mediums M199 gegeben.

Folgende Konzentrationen wurden hergestellt:

- | | |
|---|------------------------------|
| a) 2 ml Äthanol ohne Faszioлизid | auf 1 l M199 |
| b) Niclofolan: 1 mg und 2 mg | auf 1 l M199 |
| c) Niclosamid: 0,1 mg und 1 mg | auf 1 l M199 |
| d) Praziquantel: 1 mg, 10 mg, 50 mg,
100 mg | auf 1 l M199 |
| e) Triclabendazol: 3 mg, 7,5 mg, 15 mg,
30 mg, 60 mg | auf 1 l M199 |
| f) Sulfoxid: 3 mg, 7,5 mg, 15 mg, 30 mg | auf 1 l M199 |
| g) Sulphon: 3 mg, 7,5 mg, 15 mg, 30 mg | auf 1 l M199 |
| h) Praziquantel: 100 mg | auf 1 l M199 mit 10% Serum |
| i) Triclabendazol: 15 mg,
30 mg | auf 1 l M199 mit 6g% Albumin |
| k) Sulfoxid: 30 mg | auf 1 l M199 mit 6g% Albumin |
| l) Sulphon: 30 mg | auf 1 l M199 mit 6g% Albumin |

Sämtliche Versuche wurden in zeitlichem Abstand zweimal mit jeweils 10 adulten *Fasciola hepatica* Würmern ausgeführt. Medium und Medikamentenlösung wurden für jeden Versuch neu hergestellt.

Bei jedem Versuchsdurchgang lief eine Vergleichsgruppe mit Medium M199 und 2 ml Äthanol/l, ohne Fasziolizid, parallel.

3.5 Kulturgefäße

Für die Beobachtung der *Fasciola hepatica* wurden 40 ml Kulturflaschen aus Polystyrol verwendet (Nunc, Nunclon^R 152094), ein Gefäß für jeden Wurm.

In einem Vorversuch wurde geprüft, ob ein Einfluß des Gasaustausches über den Kulturmedien auf Motilität und Absterberate der *Fasciola hepatica* besteht.

Dazu wurden die Gefäße zur Hälfte offen, zur anderen Hälfte luftdicht verschlossen gehalten.

Bei der Medikamententestung wurden alle Gefäße luftdicht verschlossen.

Die Kulturgefäße mit den *Fasciola hepatica* wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Das Medium wurde durch steriles Absaugen mit Hilfe eines hitzesterilisierbaren Platinröhrchens und einer einfachen Saugpumpe sowie sofortiger Zugabe von 40 ml frischem, auf 37°C vorgewärmten Medium gewechselt.

Der Mediumwechsel wurde bei allen Untersuchungen einmal täglich vorgenommen.

3.6 Beobachtungsmethodik

Eiausscheidung.

Mit dem Stereomikroskop wurde täglich vor dem Mediumwechsel die Eizahl bestimmt.

Motilität.

Die Motilität wurde makroskopisch und unter dem Stereomikroskop (40x) beobachtet und nach folgenden Kriterien eingeteilt:

- ++ Bewegung am ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- o innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

4. Ergebnisse

4.1 Voruntersuchungen

4.1.1 Kulturmethodik

4.1.1.1 Medien

Im Medium M199 zeigten alle untersuchten *Fasciola hepatica* (n = 20) eine uneingeschränkte Motilität bis zum 10. Tag. Ab dem 11. Tag fand eine zunehmende Einschränkung der Motilität statt.

Nach mehr als 15 Tagen im Medium M199 starben erstmals *Fasciola hepatica* ab, es konnte bei drei Würmern keine Bewegung mehr unter dem Stereomikroskop erkannt werden.

Nach 28 Tagen waren sämtliche *Fasciola hepatica* ohne Motilität (Tabelle 1).

Bei Verwendung des Mediums Hedon Fleigh fand sich bereits nach 4 Tagen bei der Hälfte der beobachteten *Fasciola hepatica* eine eingeschränkte Motilität.

Am 5. Tag starben die ersten 4 *Fasciola hepatica*.

Nach 9 Tagen konnte bei sämtlichen *Fasciola hepatica* im Hedon Fleigh Medium keine Bewegung mehr festgestellt werden (Tabelle 1).

Die Absterberate der beobachteten *Fasciola hepatica* in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 1 für die verwendeten Medien M199 und Hedon Fleigh graphisch dargestellt.

4.1.1.2 Gasaustausch

Die Motilität bei Verwendung offener Gefäße war erstmals am 11. Tag eingeschränkt, am 15. Tag starben die ersten 2 *Fasciola hepatica* und nach 25 Tagen war bei sämtlichen *Fasciola hepatica* keine Bewegung mehr erkennbar.

Die Motilität, bei Verwendung luftdichter Gefäße, die keinen Gasaustausch ermöglichen, war erstmals nach 12 Tagen eingeschränkt, nach 17 Tagen starben die ersten 2 *Fasciola hepatica* und nach 29 Tagen waren sämtliche *Fasciola hepatica* abgestorben (Tabelle 2).

Die Absterberate der beobachteten *Fasciola hepatica* bei Verwendung offener und luftdichter Gefäße ist in der Abbildung 2 graphisch dargestellt.

Am 10. und am 20. Beobachtungstag ließ sich zwischen Gasaustausch und Motilität bzw. zwischen Gasaustausch und Absterberate keine signifikante Abhängigkeit feststellen ($p > 0,1$).

4.1.2 Penicillin / Streptomycin-Zusatz

Bei Verwendung des Mediums ohne antibiotischen Zusatz fielen bis zum 2. Beobachtungstag, bedingt durch die ungünstigen Bedingungen bei der Gewinnung der Würmer im Schlachthof, über 30 % der *Fasciola hepatica* durch Kontamination aus. Weitere 5 Kulturgefäße mit je einem *Fasciola hepatica* wurden während der folgenden Beobachtungszeit kontaminiert.

Bei Verwendung des Mediums mit Zusatz von 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin gab es während der gesamten Beobachtungszeit keinen einzigen Ausfall durch Kontamination.

Verwendung des Penicillin/Streptomycin-Zusatzes zum Medium M199 führte bis zum 10. Beobachtungstag zu keiner Einschränkung der Beweglichkeit. Ab dem 11. Tag nahm die Motilität ab.

Am 16. Tag konnte erstmals bei zwei *Fasciola hepatica* keine Beweglichkeit mehr unter dem Stereomikroskop festgestellt werden und nach 28 Tagen waren sämtliche *Fasciola hepatica* abgestorben (Tabelle 3).

Verwendung des Mediums M199 ohne Antibiotikazusatz zeigte bis zum 11. Tag uneingeschränkte Motilität, danach zunehmende Motilitätseinschränkung. Am 15. Tag konnte erstmals bei 4 *Fasciola hepatica* keine Beweglichkeit mehr festgestellt werden.

Sämtliche *Fasciola hepatica* waren nach 27 Tagen abgestorben (Tabelle 3).

Die Absterberate der *Fasciola hepatica* bei Verwendung von M199 mit und ohne Penicillin/Streptomycin-Zusatz ist in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Nachdem in diesem Versuch keine signifikante Abhängigkeit zwischen Antibiotikagabe und Motilität ($p > 0,1$) bzw. Antibiotikagabe und Absterberate ($p > 0,1$) festgestellt werden konnte, wurde in den folgenden Versuchen nur noch mit Zusatz von 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin gearbeitet.

4.1.3 Lösungsmittel

Der Einfluß der Zugabe von Äthanol, als Lösungsmittel für die zu testenden Medikamente auf die Motilität der *Fasciola hepatica*, wurde geprüft:

Bei Verwendung des Mediums M199, ohne Zugabe von Äthanol, war bis zum 10. Tag keine Beweglichkeitseinschränkung feststellbar. Ab dem 11. Tag fand eine zunehmende Beweglichkeitseinschränkung statt und am 15. Tag konnten erstmals *Fasciola hepatica* ohne Motilität festgestellt werden.

Nach 30 Tagen waren sämtliche *Fasciola hepatica* abgestorben, d.h. es ließ sich keine Beweglichkeit mehr unter dem Stereomikroskop feststellen.

Zugabe von 2 ml/l Äthanol zum M199 führte bis zum 9. Tag zu keiner Beweglichkeitseinschränkung, ab dem 10. Tag fand eine zunehmende Motilitätseinschränkung statt und ab dem 16. Tag fanden sich erstmals *Fasciola hepatica* ohne Motilität.

Nach 30 Tagen waren sämtliche *Fasciola hepatica* abgestorben (Tabelle 4).

Die Absterberate der beobachteten *Fasciola hepatica* ist in der Abbildung 4 für die Verwendung von M199 mit und ohne 2 ml/l Äthanolzusatz graphisch dargestellt.

Äthanol führte zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der Motilität und Absterberate ($p > 0,1$). Es wurde daher als Lösungsmittel für die Medikamente der folgenden Versuche verwendet.

4.1.4 Eiausscheidung

Am ersten Untersuchungstag fanden sich in sämtlichen Kulturgefäßen große Mengen Eier von *Fasciola hepatica*. Eine genaue Zählung innerhalb der Kulturgefäße war nicht möglich, da sich viele Eier in den Kanten der Kulturgefäße sammelten. Nach dem Absaugen mit der elektrischen Saugpumpe verblieb noch eine große Zahl Eier im Gefäß. Nur nach mehrfachem Durchspülen mit M199 bzw. Hedon Fleigh-Lösung und wiederholtem Absaugen konnten alle Eier entfernt werden. Die Bestimmung der Eiausscheidung wurde daher semiquantitativ ausgeführt und folgendermaßen eingeteilt:

++	mehr als 100 Eier im Kulturgefäß
+	weniger als 100 Eier, mehr als 10
0	weniger als 10 Eier

Die Ergebnisse sind aus Tabelle 5a und b ersichtlich.

Ab dem 3. Beobachtungstag war sowohl im Medium M199 wie auch in der Hedon Fleigh-Lösung keine Eiausscheidung mehr nachweisbar. Daher wurde die Eiausscheidung in den folgenden Untersuchungen nicht weiter beobachtet.

MEDIUM		M199			HEDON FLEIGH		
Beobachtungstag	Motilität	++	+	0	++	+	0
1		20			19	1	
2		20			17	3	
3		20			13	7	
4		20			10	10	
5		20			6	10	4
6		20			3	9	8
7		20			1	6	13
8		20				2	18
9		20					20
10		20					20
11		18	2				20
12		17	3				20
13		13	7				20
14		8	12				20
15		6	14				20
16		6	11	3			20
17		4	12	4			20
18		4	11	5			20
19		4	9	7			20
20		3	9	8			20
21		2	9	9			20
22		2	8	10			20
23		1	6	13			20
24		1	5	14			20
25			5	15			20
26			2	18			20
27			1	19			20
28				20			20
29				20			20
30				20			20
31				20			20

Tabelle 1: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) bei Verwendung der Medien M199 und Hedon Fleigh.

Einteilung der Motilität:

- ++ Bewegung über den ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- 0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

MEDIUM M199	OHNE GASAUUSTAUSCH			MIT GASAUUSTAUSCH		
Motilität	++	+	0	++	+	0
Beobachtungstag						
1	20			20		
2	20			20		
3	20			20		
4	20			20		
5	20			20		
6	20			20		
7	20			20		
8	20			20		
9	20			20		
10	20			20		
11	20			18	2	
12	17	3		15	5	
13	15	5		15	5	
14	15	5		12	8	
15	11	9		8	10	2
16	11	9		8	10	2
17	10	8	2	8	8	4
18	9	8	3	7	6	7
19	9	6	5	5	6	9
20	6	7	7	3	5	12
21	3	8	9	2	6	12
22	1	5	14		6	14
23		5	15		3	17
24		5	15		3	17
25		4	16			20
26		4	16			20
27		2	18			20
28		1	19			20
29			20			20
30			20			20

Tabelle 2: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) bei Verwendung des Mediums M199 mit und ohne Gasaustausch

Einteilung der Motilität:

- ++ Bewegung über den ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- 0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

MEDIUM M199	mit 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin			ohne Antibiotikazusatz		
Motilität	++	+	0	++	+	0
Beobachtungstag						
1	20			20		
2	20			20		
3	20			20		
4	20			20		
5	20			20		
6	20			20		
7	20			20		
8	20			20		
9	20			20		
10	20			20		
11	19	1		20		
12	15	5		17	3	
13	9	11		10	10	
14	9	11		7	13	
15	6	14		6	10	4
16	6	12	2	5	11	4
17	6	10	4	5	11	4
18	4	10	6	4	12	4
19	4	8	8	2	11	7
20	4	8	8	2	9	9
21	3	7	10	1	9	10
22	2	8	10	1	6	13
23	1	7	12	1	6	13
24	1	5	14	1	3	16
25		4	16		3	17
26		2	18		3	17
27		2	18			20
28			20			20
29			20			20
30			20			20

Tabelle 3: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) mit und ohne Zugabe von 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin zum Medium M199

Einteilung der Motilität:

- ++ Bewegung über den ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- 0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

MEDIUM M199	OHNE ÄTHANOL			MIT ÄTHANOL		
Motilität	++	+	0	++	+	0
Beobachtungstag						
1	20			20		
2	20			20		
3	20			20		
4	20			20		
5	20			20		
6	20			20		
7	20			20		
8	20			20		
9	20			20		
10	20			19	1	
11	19	1		19	1	
12	18	2		19	1	
13	17	3		17	3	
14	15	5		17	3	
15	14	5	1	16	4	
16	10	9	1	13	5	2
17	9	9	2	10	7	3
18	9	6	5	8	6	6
19	6	6	8	7	6	7
20	5	6	9	4	6	10
21	5	5	10	4	5	11
22	3	5	12	3	5	12
23	2	5	13	1	5	14
24	1	5	14	1	5	14
25		4	16	1	5	14
26		4	16		5	15
27		3	17		3	17
28		3	17		2	18
29		1	19		2	18
30			20			20

Tabelle 4: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) mit und ohne Zugabe von Äthanol als Lösungsvermittler für die Medikamente bei Verwendung des Mediums M199

Einteilung der Motilität:

- ++ Bewegung über den ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- 0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

MEDIUM	M199									
Fasciola hepatica No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Beobachtungstag										
1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 5a

MEDIUM	HEDON FLEIGH									
Fasciola hepatica No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Beobachtungstag										
1	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++
2	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 5b

Tabelle 5a und b: Eiausscheidung von *Fasciola hepatica* (n = 10)
bei Verwendung der Medien M199 und Hedon Fleigh

Bestimmung der Eizahl:

- ++ mehr als 100 Eier im Kulturgefäß
- + weniger als 100 Eier, mehr als 10
- 0 weniger als 10 Eier

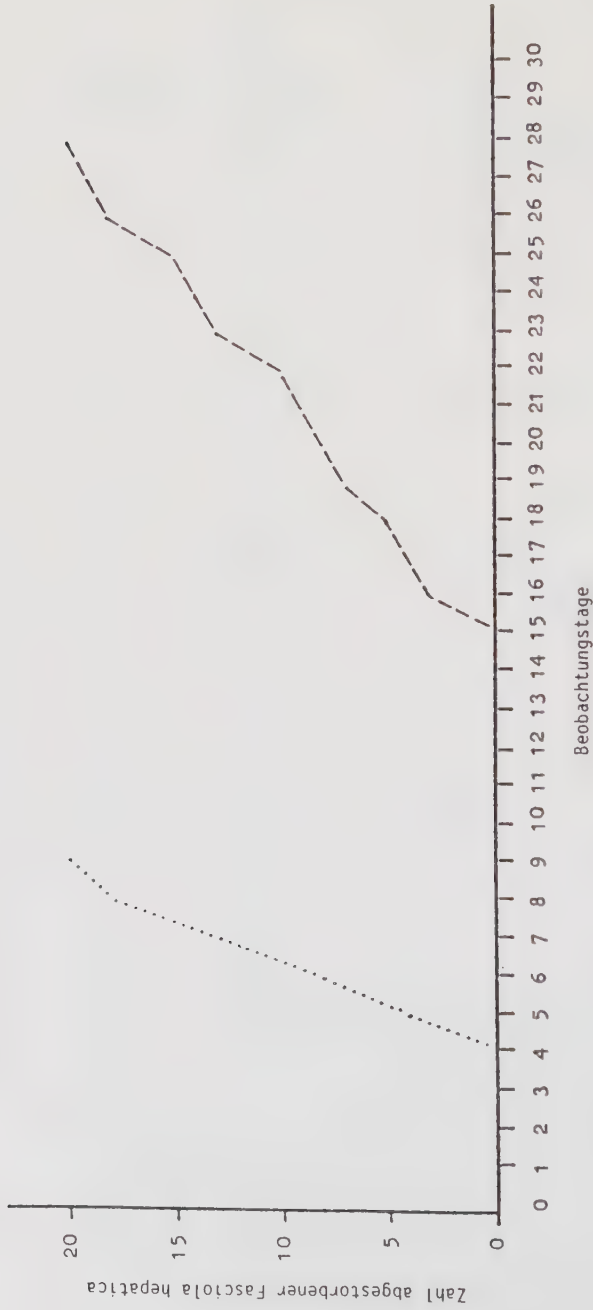


Abbildung 1:

Absterberaten von *Fasciola hepatica* ($n = 20$) bei Verwendung der Medien Hedon Fleigh und M199

..... Hedon Fleigh

----- M199

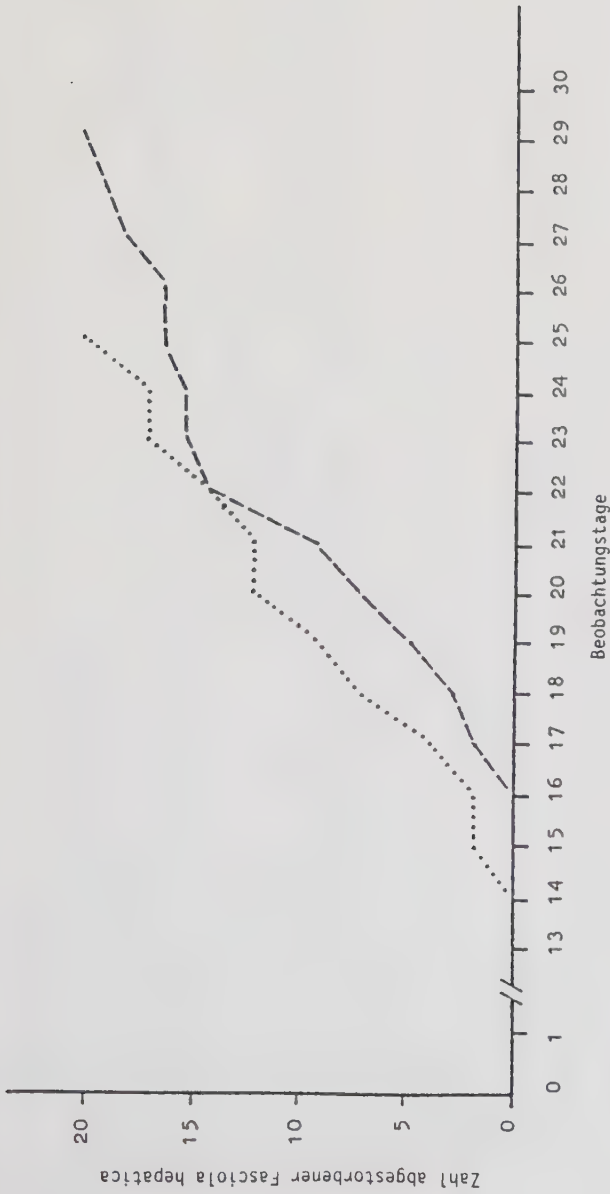


Abbildung 2:

Absterberaten von *Fasciola hepatica* (n = 20) im Medium M199 mit und ohne Gasaustausch

..... ohne Gasaustausch
--- mit Gasaustausch

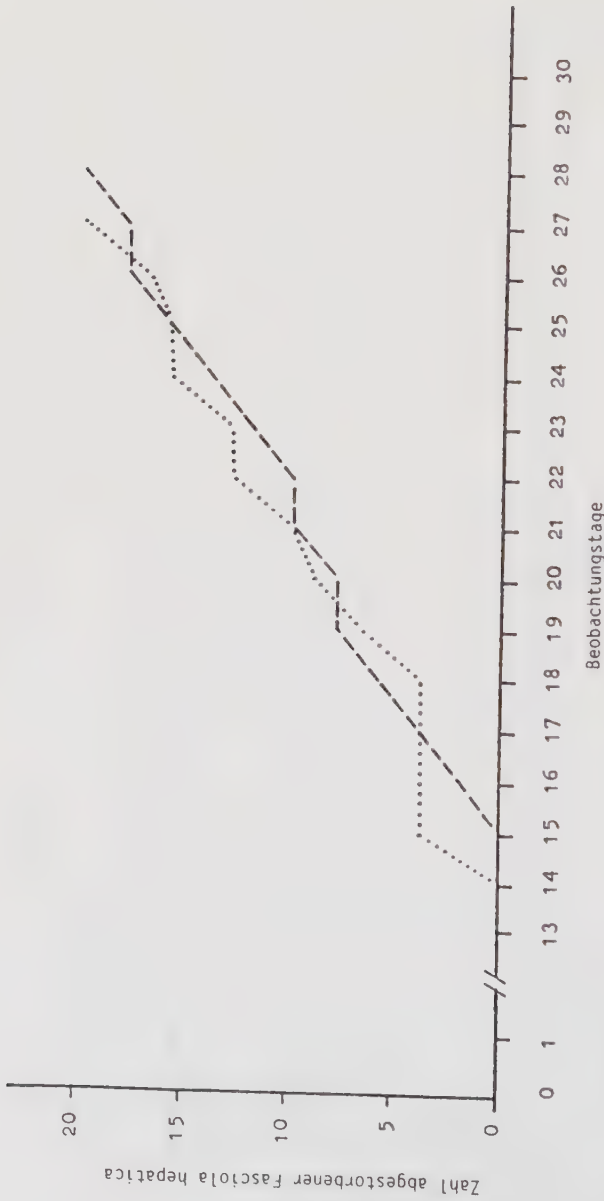


Abbildung 3:

Absterberate von *Fasciola hepatica* ($n = 20$) im Medium M199 mit und ohne Penicillin/Streptomycin-Zusatz

..... ohne Antibiotika

--- mit 50 IE Penicillin/Streptomycin

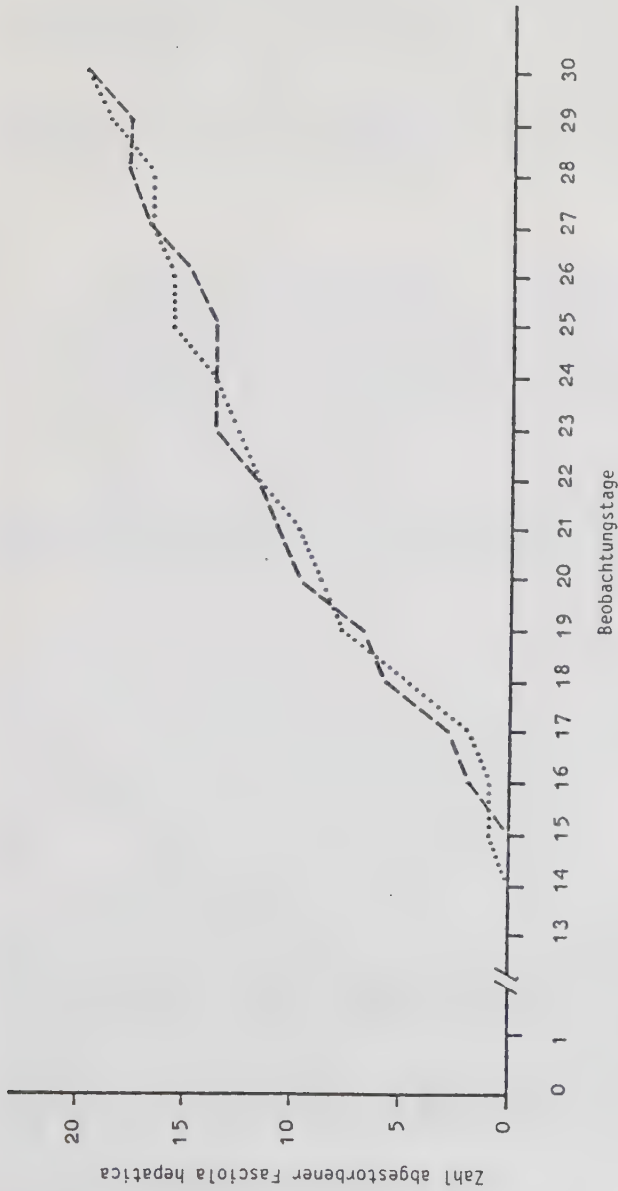


Abbildung 4:

Absterberaten von *Fasciola hepatica* ($n = 20$) im Medium M199 mit und ohne Äthanolzugabe

..... ohne Äthanol

--- mit Äthanol 2 ml/l

4.2 Medikamentenuntersuchung

4.2.1 Niclofolan

Inkubation von *Fasciola hepatica* (n = 20) in 1 mg/l Niclofolan führte bereits nach 6 Stunden zum Absterben von 5 Würmern. Nach 24 Stunden war kein lebender *Fasciola hepatica* mehr unter dem Stereomikroskop erkennbar.

Inkubation in 2 mg/l Niclofolan führte bereits nach weniger als 3 Stunden zum Absterben von 4 *Fasciola hepatica*. Nach 18 Stunden waren sämtliche *Fasciola hepatica* ohne Motilität (Tabelle 6).

4.2.2 Niclosamid

Inkubation von *Fasciola hepatica* (n = 20) in 0,1 mg/l Niclosamid führte nach 6 Stunden zu zunehmender Einschränkung der Motilität. Nach 24 Stunden war die Hälfte, nach 42 Stunden sämtliche *Fasciola hepatica* abgestorben.

Inkubation in 1 mg/l Niclosamid führte bereits nach weniger als 6 Stunden zum Absterben sämtlicher *Fasciola hepatica* (Tabelle 6).

Die Absterberaten von *Fasciola hepatica* bei Inkubation in Niclofolan und Niclosamid sind in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

4.2.3 Praziquantel

Bei der Inkubation von *Fasciola hepatica* in Praziquantel wurden folgende Werte ermittelt:

Erstmalige Einschränkung der Motilität bereits

am 1. Tag bei Inkubation in 50 mg/l Praziquantel,

am 2. Tag in 100 mg/l und

am 3. Tag in 1 mg/l und 10 mg/l Praziquantel.

Am 10. Beobachtungstag war die Motilität von 6 der in 1 mg/l Praziquantel inkubierten *Fasciola hepatica* deutlich vermindert, in 10 mg/l Praziquantel waren bereits 7 in ihrer Motilität deutlich eingeschränkt. Sämtliche in 100 mg/l bzw. 50 mg/l Praziquantel inkubierte *Fasciola hepatica* zeigten bereits am 2. bzw. 9. Tag eine verminderte Motilität (Tabelle 7).

In der Kontrollgruppe mit 2 mg/l Äthanol ohne Praziquantel wurde eine Einschränkung der Motilität erst am 11. Tag beobachtet.

Inkubation der *Fasciola hepatica* in 100 mg/l Praziquantel bei Zugabe von 10 % Human A Rh+ Serum führte zur Einschränkung der Motilität ab dem 7. Tag. Nach mehr als 8 Tagen war die Beweglichkeit sämtlicher *Fasciola hepatica* deutlich eingeschränkt. (Tabelle 8)

Erstmaliges Absterben von *Fasciola hepatica* wurde beobachtet

- am 11. Tag bei Inkubation in 1 mg/l Praziquantel,
- am 12. Tag in 100 mg/l,
- am 14. Tag in 50 mg/l und
- am 18. Tag in 10 mg/l Praziquantel. (Tabelle 7)

In der Kontrollgruppe mit 2 mg/l Äthanol ohne Praziquantel wurden erstmals am 16. Tag *Fasciola hepatica* Würmer ohne Motilität gefunden.

Keine Motilität bei sämtlichen *Fasciola hepatica*, d.h. Absterben aller Würmer, fand sich bei allen verwendeten Konzentrationen von Praziquantel erst nach mehr als 20 Tagen (Tabelle 7).

"chi-Quadrat-Test":

Die Versuche zeigten vom 2. bis zum 13. Tag einen signifikanten Einfluß ($p < 0,001$) des Praziquantels auf die Motilität von *Fasciola hepatica* bei Verwendung der Konzentrationen 50 mg/l und 100 mg/l Praziquantel. Verwendung der Konzentrationen 1 mg/l und 10 mg/l zeigte einen signifikanten Einfluß ($p < 0,01$) des Praziquantels auf die Motilität von *Fasciola hepatica* am 11. und 12. Tag.

Es konnte kein signifikanter Einfluß des Praziquantels auf die Absterberate von *Fasciola hepatica* gefunden werden.

Die Absterberaten von *Fasciola hepatica* bei Inkubation in Praziquantel sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

4.2.4

Triclabendazol

Bei der Inkubation der *Fasciola hepatica* in Triclabendazol wurden folgende Werte ermittelt:

Erstmalige Einschränkung der Motilität der *Fasciola hepatica*

- nach weniger als 3 Stunden bei Inkubation in 30 und 60 mg/l Triclabendazol,
- nach mehr als 6 Stunden in 15 mg/l und
- nach mehr als 12 Stunden bei Inkubation in 3 und 7,5 mg/l Triclabendazol (Tabelle 9).

Desgleichen nach 36 Stunden bzw. 60 Stunden bei Inkubation in 30 bzw. 15 mg/l Triclabendazol bei Zugabe von 60 g/l Albumin zum Medium M199 (Tabelle 12).

Fasciola hepatica ohne Motilität wurden erstmals unter dem Stereomikroskop gefunden

nach 3 Stunden	in 60 mg/l Triclabendazol,
nach 6 Stunden	in 30 mg/l Triclabendazol,
nach 18 Stunden	in 15 mg/l Triclabendazol,
nach 30 Stunden	in 7,5 mg/l Triclabendazol,
nach 36 Stunden	in 3 mg/l Triclabendazol.

(Tabelle 9, Abbildung 7)

Desgleichen nach 48 bzw. 72 Stunden bei Inkubation in 30 bzw. 15 mg/l Triclabendazol bei Zugabe von 60 g/l Albumin zum Medium M199 (Tabelle 12).

Sämtliche *Fasciola hepatica* waren unbeweglich und damit abgestorben

nach 6 Stunden	in 60 mg/l,
nach 18 Stunden	in 30 mg/l,
nach 30 Stunden	in 15 mg/l,
nach 48 Stunden	in 7,5 mg/l und
nach 78 Stunden	in 3 mg/l Triclabendazol.

(Tabelle 9, Abbildung 7)

Desgleichen nach 96 bzw. 168 Stunden bei Inkubation in 30 bzw. 15 mg/l Triclabendazol bei Zugabe von 60 g/l Albumin zum Medium M199 (Tabelle 12, Abbildung 10).

Versuchsweise wurden die Gefäße sämtlicher *Fasciola hepatica*, die bei der Beobachtung erstmals keine Beweglichkeit mehr unter dem Stereomikroskop zeigten, mit frischem Medium M199 aufgefüllt und weiter beobachtet. Es wurde keine Wiederkehr der Motilität festgestellt (Tabelle 9).

"chi-Quadrat-Test":

Die Versuche zeigten einen signifikanten Einfluß ($p < 0,001$) des Triclabendazols auf die Absterberate von *Fasciola hepatica*

nach 66 Stunden bei	3 mg/l,
nach 42 Stunden bei	7,5 mg/l,
nach 24 Stunden bei	15 mg/l,
nach 12 Stunden bei	30 mg/l und
nach 6 Stunden bei	60 mg/l Triclabendazol.

4.2.5 Triclabendazol-Sulfoxidmetabolit

Inkubation der *Fasciola hepatica* in Triclabendazol-Sulfoxid führte erstmals zu deutlicher Einschränkung der Motilität

nach weniger als	6 Stunden in	30 mg/l Sulfoxid,
nach	12 Stunden in	7,5 mg/l und 15 mg/l Sulfoxid und
nach	30 Stunden in	3 mg/l Sulfoxid.

(Tabelle 10)

Desgleichen nach 72 Stunden in 30 mg/l Sulfoxid bei Zugabe von 60 g/l Albumin (Tabelle 12).

Fasciola hepatica ohne Motilität konnten erstmals

nach	6 Stunden in	30 mg/l,
nach	18 Stunden in	15 mg/l,
nach	30 Stunden in	7,5 mg/l und
nach	60 Stunden in	3 mg/l Sulfoxid

beobachtet werden. (Tabelle 10)

Desgleichen nach 120 Stunden in 30 mg/l Sulfoxid bei Zugabe von 60 g/l Albumin (Tabelle 12).

Sämtliche *Fasciola hepatica* zeigten keine Motilität mehr

nach 30 Stunden in	30 mg/l Triclabendazol-Sulfoxid- metabolit,
nach 42 Stunden in	15 mg/l
nach 60 Stunden in	7,5 mg/l und
nach 90 Stunden in	3 mg/l. (Tabelle 10, Abbildung 8)

Desgleichen nach 264 Stunden in 30 mg/l Sulfoxid bei Zugabe von 60 g/l Albumin (Tabelle 12, Abbildung 10).

Die Gefäße sämtlicher *Fasciola hepatica*, die bei der Beobachtung erstmals keine Beweglichkeit mehr unter dem Stereomikroskop zeigten, wurden mit frischem Medium M199 aufgefüllt und weiter beobachtet. Es konnten keine erneuten Bewegungen mehr festgestellt werden (Tabelle 10).

"chi-Quadrat-Test":

Die Versuche zeigten einen signifikanten Einfluß ($p < 0,001$) des Triclabendazol-Sulfoxidmetaboliten auf die Absterberate von *Fasciola hepatica*

nach 72 Stunden bei 3 mg/l,
nach 54 Stunden bei 7,5 mg/l,
nach 30 Stunden bei 15 mg/l und
nach 18 Stunden bei 30 mg/l Sulfoxid.

4.2.6 Triclabendazol-Sulphonmetabolit

Inkubation der *Fasciola hepatica* in Triclabendazol-Sulphon zeigte erstmalige deutliche Einschränkung der Motilität

nach weniger als 3 Stunden bei Inkubation in 30 mg/l Sulphon,
nach 6 Stunden in 5 mg/l,
nach 12 Stunden in 7,5 mg/l,
nach 48 Stunden bei einer Konzentration von 3 mg/l Sulphon.

(Tabelle 11)

Desgleichen nach 24 Stunden in 30 mg/l Sulphon bei Zugabe von 60 g/l Albumin (Tabelle 12).

Erstmalige Beobachtung von *Fasciola hepatica* ohne Motilität fand sich

nach 3 Stunden bei Inkubation in 30 mg/l Sulphon,
nach 12 Stunden in 15 mg/l,
nach 24 Stunden in 7,5 mg/l und
nach 48 Stunden bei 3 mg/l Sulphon Triclabendazol.

(Tabelle 11)

Desgleichen nach 36 Stunden bei Inkubation in 30 mg/l Sulphon bei Zugabe von 60 g/l Albumin.
(Tabelle 12)

Sämtliche *Fasciola hepatica* zeigten keine Motilität mehr

nach 12 Stunden bei Inkubation in 30 mg/l Sulphon,
nach 24 Stunden in 15 mg/l,
nach 48 Stunden in 7,5 mg/l und
nach 132 Stunden in 3 mg/l Sulphon.

(Tabelle 11)

Desgleichen nach 108 Stunden bei Inkubation in 30 mg/l Sulphon bei Zugabe von 60 g/l Albumin (Tabelle 12, Abbildung 10).

Die Absterberaten der *Fasciola hepatica* unter dem Einfluß von Sulphon-Triclabendazol sind in der Abbildung 9 graphisch dargestellt.

Die Gefäße sämtlicher *Fasciola hepatica*, die bei der Beobachtung erstmals keine Beweglichkeit mehr unter dem Stereomikroskop zeigten, wurden mit frischem Medium M199 aufgefüllt und weiter beobachtet. Es wurde keine erneute Bewegung festgestellt (Tabelle 11).

"chi-Quadrat-Test":

Die Versuche zeigten einen signifikanten Einfluß ($p < 0,001$) des Triclabendazol-Sulphonmetaboliten auf die Absterberate von *Fasciola hepatica*

nach 84 Stunden bei 3 mg/l,

nach 36 Stunden bei 7,5 mg/l,

nach 18 Stunden bei 15 mg/l und bereits

nach 6 Stunden bei 30 mg/l Sulphon.

MEDIKAMENT	NICLOFOLAN			NICLOSAMID		
KONZENTRATION	1 mg/l			0,1 mg/l		
	2 mg/l			1 mg/l		
Motilität	++	+	0	++	+	0
Beobachtungszeit (Stunden)						
3	10	10		1	15	4
6	1	14	5	7	13	16
12		12	8	2	18	20
18		3	17		20	20
24			20		10	10
30			20		3	17
36			20		1	19
42			20			20
48			20			20

Tabelle 6: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) bei Zugabe von Niclofolan und Niclosamid zum Medium M199

Einteilung der Motilität:

- ++ Bewegung am ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- 0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

MEDIKAMENT	PRAZIQUANTEL				
KONZENTRATION	0 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	50 mg/l	100 mg/l
Motilität	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0
Beobachtungstag					
1	20	20	20	3 17	20
2	20	20	20	3 17	20
3	20	19 1	19 1	3 17	20
4	20	19 1	18 2	3 17	20
5	20	18 2	18 2	2 18	20
6	20	18 2	18 2	2 18	20
7	20	18 2	17 3	2 18	20
8	20	18 2	16 4	2 18	20
9	20	17 3	15 5	20	20
10	20	14 6	13 7	20	20
11	18 2	8 8 4	7 13	20	20
12	16 4	5 11 4	6 14	20	19 1
13	10 10	4 12 4	6 14	20	15 5
14	7 13	4 11 5	6 14	17 3	13 7
15	5 15	4 10 6	3 17	16 4	9 11
16	6 11 3	3 10 7	2 18	16 4	8 12
17	6 11 3	13 7	20	15 5	5 15
18	2 12 6	10 10	16 4	14 6	4 16
19	3 9 8	10 10	14 6	14 6	3 17
20	3 8 9	7 13	13 7	12 8	20
21	3 7 10	5 15	9 11	11 9	20
22	1 9 10	3 17	8 12	9 11	20
23	1 7 12	2 18	8 12	4 16	20
24	1 4 15	1 19	7 13	2 18	20
25	3 17	20	5 15	1 19	20
26	1 19	20	2 18	20	20
27	1 19	20	1 19	20	20
28	1 19	20	1 19	20	20
29	1 19	20	1 19	20	20
30	20	20	1 19	20	20
31	20	20	20	20	20

Tabelle 7: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) bei Zugabe von Praziquantel zum Medium M199

MEDIKAMENT	M 199 mit 10 % Human A Rh+ Serum		
	Ohne Praziquantel	Mit Praziquantel	
KONZENTRATION	0	100 mg/l	
Motilität	++ + 0	++ + 0	
Beobachtungstag			
1	20	20	
2	20	20	
3	20	20	
4	20	20	
5	20	20	
6	20	20	
7	20	18	2
8	20	10	10
9	20	20	
10	20	20	
11	20	20	
12	20	20	

Tabelle 8: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) bei Zugabe von Praziquantel zum Medium M 199 mit 10 % Human A Rh+ Serum

Einteilung der Motilität:

- ++ Bewegung am ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- 0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

MEDIKAMENT	TRICLABENDAZOL					
KONZENTRATION	0 mg/l	3 mg/l	7,5 mg/l	15 mg/l	30 mg/l	60 mg/l
Motilität	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0
Beobachtungszeit (Stunden)						
3	20	20	20	20	15 5	7 10 3
6	20	20	20	20	8 10 2	20
12	20	20	20	16 4	4 16	20
18	20	18 2	19 1	13 7	20	20
24	20	16 4	12 8	2 18	20	20
30	20	11 9	2 17 1	20	20	20
36	20	10 9 1	11 9	20	20	20
42	20	10 7 3	3 17	20	20	20
48	20	8 8 4	20	20	20	20
54	20	2 10 8	20	20	20	20
60	20	11 9	20	20	20	20
66	20	9 11	20	20	20	20
72	20	3 17	20	20	20	20
78	20	20	20	20	20	20
84	20	20	20	20	20	20
90	20	20	20	20	20	20
96	20	20	20	20	20	20

Tabelle 9: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) bei Zugabe von Triclabendazol zum Medium M199

Einteilung der Motilität:

- ++ Bewegung am ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- 0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

MEDIKAMENT	TRICLABENDAZOL-SULFOXIDMETABOLIT				
KONZENTRATION	0 mg/l	3 mg/l	7,5 mg/l	15 mg/l	30 mg/l
Motilität	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0
Beobachtungszeit (Stunden)					
6	20	20	20	20	8 11 1
12	20	20	19 1	17 3	4 11 5
18	20	20	19 1	9 9 2	6 14
24	20	20	12 8	16 4	1 19
30	20	14 6	5 14 1	9 11	20
36	20	12 8	2 15 3	2 18	20
42	20	11 9	2 11 7	20	20
48	20	6 14	11 9	20	20
54	20	4 16	3 17	20	20
60	20	4 15 1	20	20	20
66	20	3 15 2	20	20	20
72	20	1 9 10	20	20	20
78	20	2 7 11	20	20	20
84	20	3 17	20	20	20
90	20	20	20	20	20
96	20	20	20	20	20

Tabelle 10: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) bei Zugabe des Triclabendazol-sulfoxidmetaboliten zum Medium M199

Einteilung der Motilität:

- ++ Bewegung über den ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- 0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

MEDIKAMENT	TRICLABENDAZOL -SULPHONMETABOLIT				
KONZENTRATION	0 mg/l	3 mg/l	7,5 mg/l	15 mg/l	30 mg/l
Motilität	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0
Beobachtungszeit (Stunden)					
3	20	20	20	20	10 7 3
6	20	20	20	17 3	3 17
12	20	20	18 2	8 10 2	20
18	20	20	10 10	2 18	20
24	20	20	3 16 1	20	20
30	20	20	15 5	20	20
36	20	20	7 13	20	20
42	20	20	2 18	20	20
48	20	17 2 1	20	20	20
60	20	14 4 2	20	20	20
72	20	7 7 6	20	20	20
84	20	4 4 12	20	20	20
96	20	3 17	20	20	20
108	20	3 17	20	20	20
120	20	1 19	20	20	20
132	20	20	20	20	20

Tabelle 11: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) bei Zugabe des Triclabendazol-Sulphonmetaboliten zum Medium M199

Einteilung der Motilität:

- ++ Bewegung über den ganzen Körper erkennbar
- + Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar
- 0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

MEDIKAMENT	Kontrolle	Triclabendazol		Sulfoxid	Sulphon
KONZENTRATION	0 mg/l	15 mg/l	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l
Motilität	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0	++ + 0
Beobachtungszeit (Stunden)					
12	20	20	20	20	20
24	20	20	20	20	18 2
36	20	20	16 4	20	13 6 1
48	20	20	15 2 3	20	8 8 4
60	20	16 4	9 6 5	20	7 9 4
72	20	16 3 1	4 16	19 1	8 5 7
84	20	14 5 1	1 19	18 2	2 7 11
96	20	10 6 4	20	17 3	2 18
108	20	9 6 5	20	15 5	20
120	20	4 8 8	20	12 4 4	20
132	20	1 7 12	20	12 4 4	20
144	20	6 14	20	10 6 4	20
156	20	3 17	20	10 6 4	20
168	20	20	20	10 6 4	20
180	20	20	20	7 7 6	20
192	20	20	20	6 4 10	20
204	20	20	20	4 3 13	20
216	20	20	20	1 4 15	20
228	20	20	20	2 18	20
240	20	20	20	1 19	20
252	20	20	20	19	20
264	19 1	20	20	20	20

Tabelle 12: Motilität von *Fasciola hepatica* (n = 20) bei Zugabe von Triclabendazol und seinen Sulfoxid- und Sulphonmetaboliten zum Medium M199 mit 60 g/l Albumin

Einteilung der Motilität:

++ Bewegung über den ganzen Körper erkennbar

+ Bewegung über weniger als 1/4 der Körperlänge erkennbar

0 innerhalb von 60 Sekunden keine Bewegung erkennbar

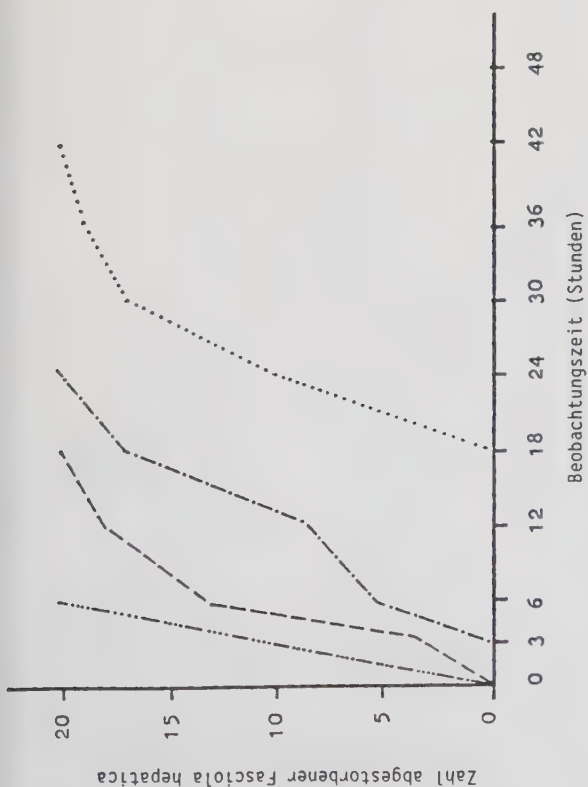


Abbildung 5:

Absterberaten von *Fasciola hepatica* (n = 20) im Medium M199 bei Inkubation in Niclofolan und Niclosamid

.....	Niclofolan	1	mg/l
-----	Niclofolan	2	mg/l
.....	Niclosamid	0,1	mg/l
-----	Niclosamid	1	mg/l

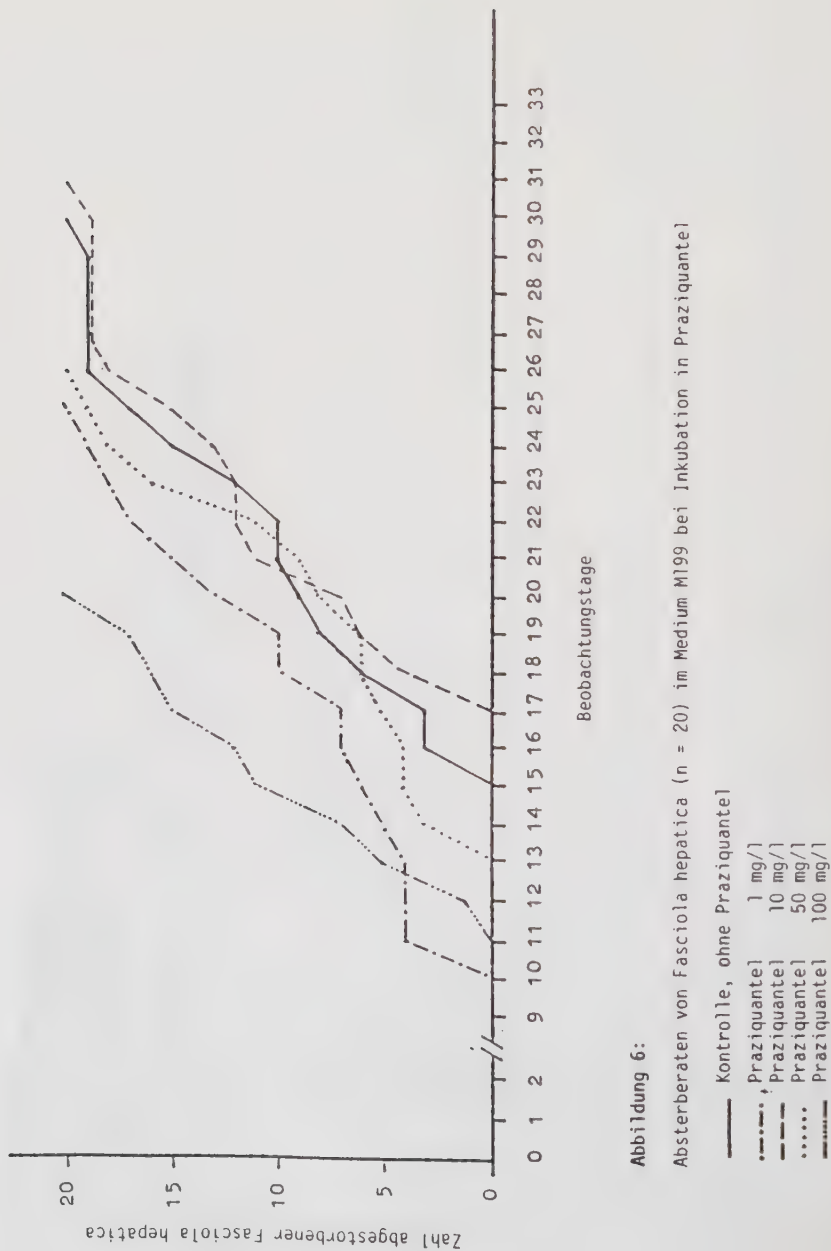


Abbildung 6:

Absterberaten von *Fasciola hepatica* ($n = 20$) im Medium M199 bei Inkubation in Praziquantel

- Kontrolle, ohne Praziquantel
- Praziquantel 1 mg/l
- Praziquantel 10 mg/l
- Praziquantel 50 mg/l
- Praziquantel 100 mg/l

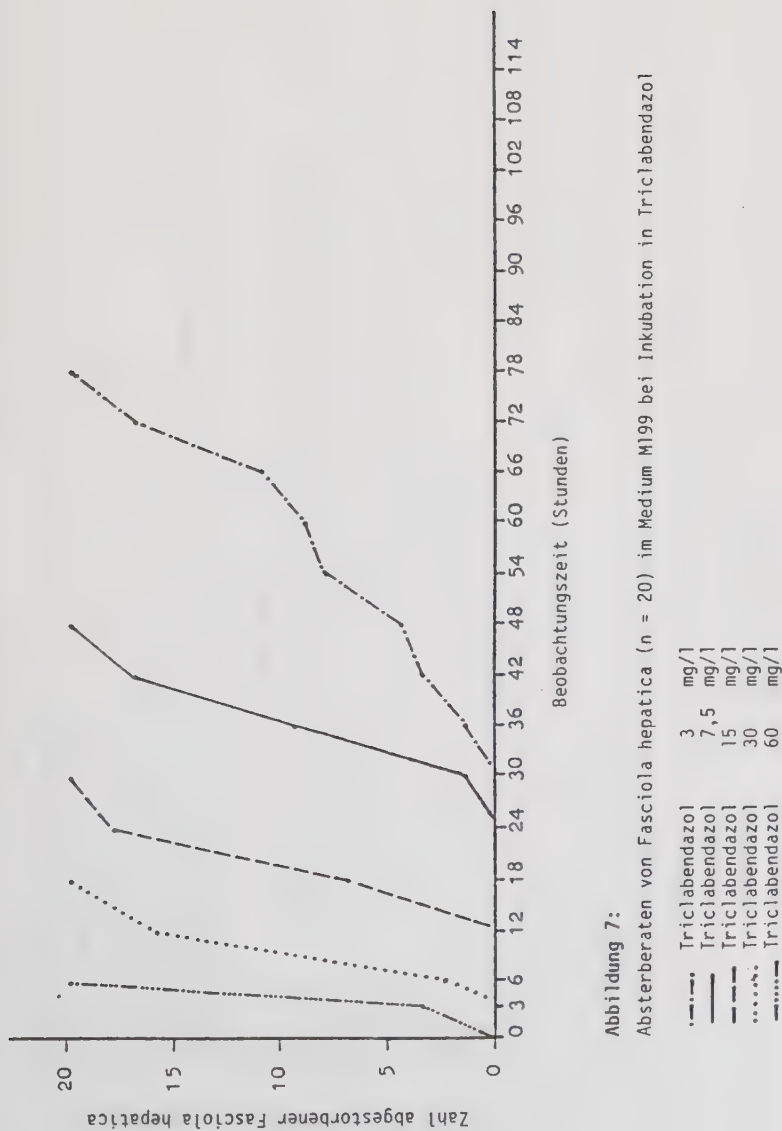
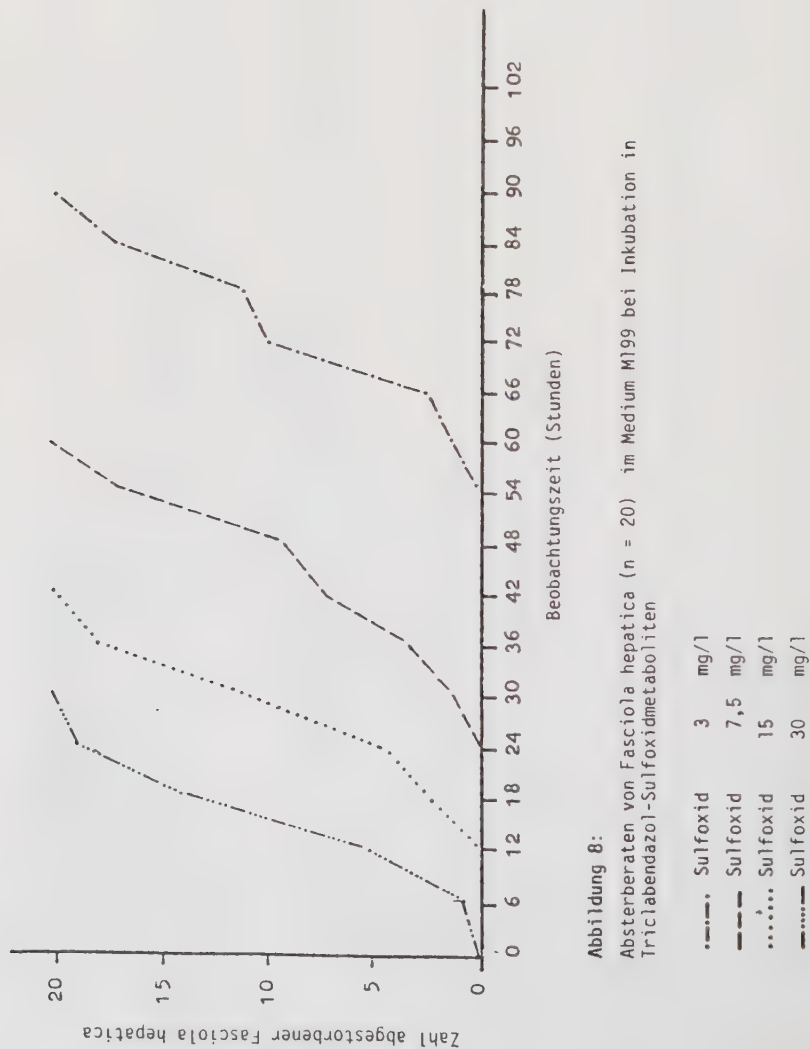
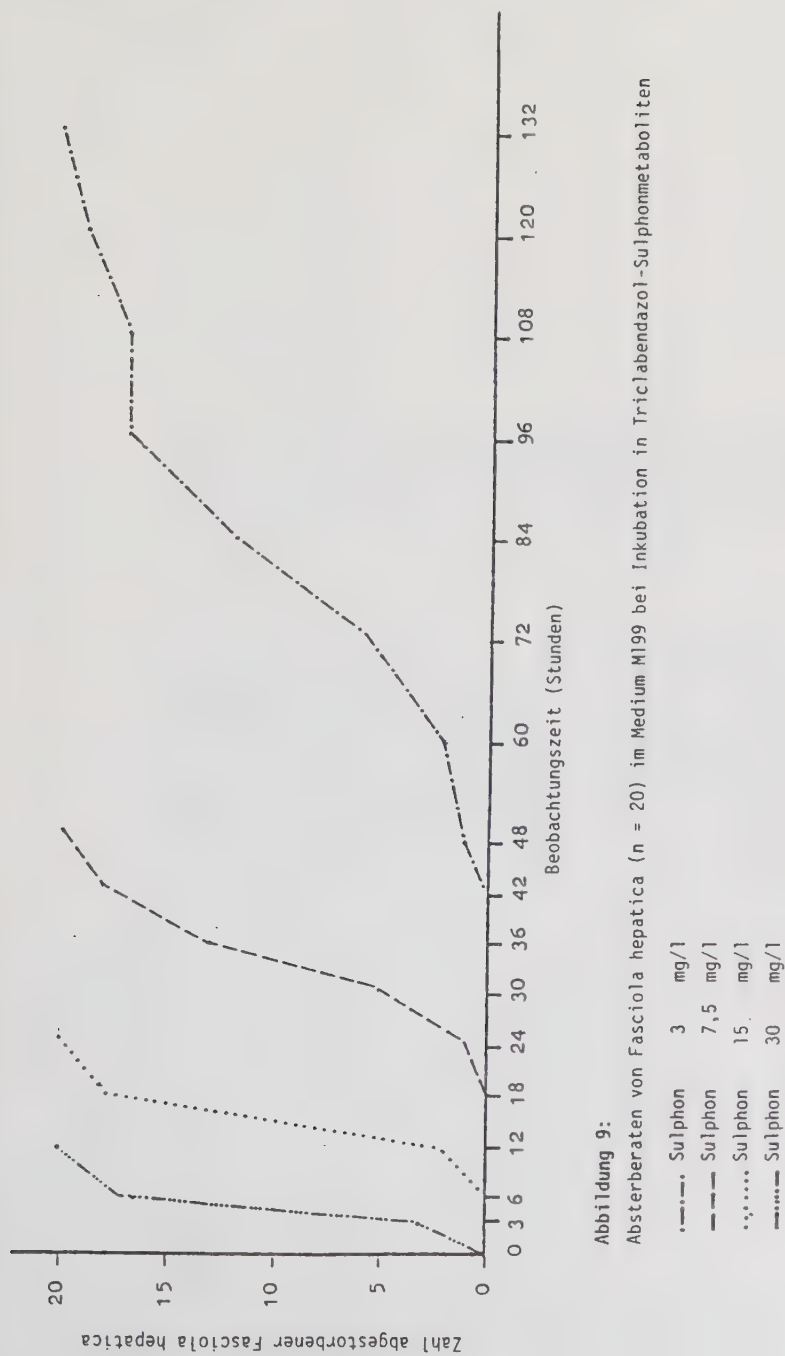


Abbildung 7:
Absterberaten von *Fasciola hepatica* (n = 20) im Medium M199 bei Inkubation in Triclabendazol





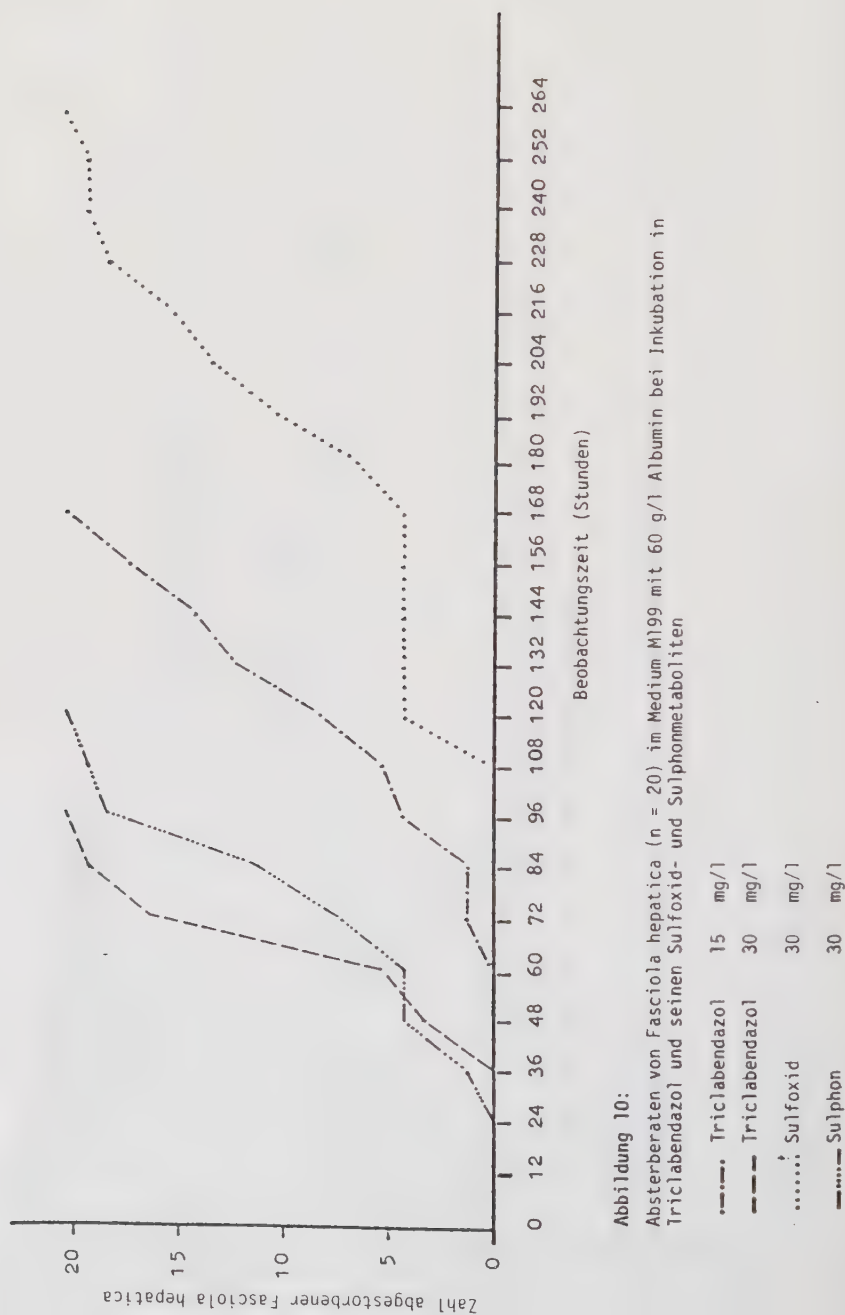


Abbildung 10:
Absterberaten von *Fasciola hepatica* (n = 20) im Medium M199 mit 60 g/l Albumin bei Inkubation in
Triclabendazol und seinen Sulfoxid- und Sulphonmetaboliten

— · — Triclabendazol 15 mg/l
 - - - Triclabendazol 30 mg/l
 Sulfoxid 30 mg/l
 - - - - Sulphon 30 mg/l

5. Diskussion

5.1 Zuverlässigkeit und Aussagekraft der Untersuchungen

5.1.1 Gewinnungsmethode

Das genaue Alter der adulten Leberegel bei Versuchsbeginn und eventuelle Vorbehandlungen der Wirtstiere mit Fasziofiziden waren nicht bekannt. Um daraus entstehende Fehler rechtzeitig zu erkennen und weitgehend zu eliminieren, lief bei jedem Versuch eine Kontrollgruppe ohne Behandlung parallel.

5.1.2 Medium

Nur das Medium M199 gewährte eine uneingeschränkte Motilität von über 10 Tagen und wurde somit den gesetzten Vorbedingungen für die Medikamententestung gerecht.

Zugunsten einer definierten und wiederholbaren Zusammensetzung des Mediums mußte auf physiologische Bestandteile des Gallensaftes, in dem die *Fasciola hepatica* in vivo leben, verzichtet werden.

Der pH des gewonnenen Mediums wurde mit Hilfe von 2,2 g NaHCO_3 auf 7,3 eingestellt und lag somit im physiologischen Bereich des Gallensaftes (pH 5, 7-8, 6).

5.1.3 Antibiotischer Zusatz

Den verwendeten Medien M199 und Hedon Fleigh wurden als Kontaminationsschutz gegen bakterielle Keime 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin zugegeben.

Die Wechselwirkung zwischen Penicillin und/oder Streptomycin und den Anthelminthika wurde nicht untersucht.

Der Einfluß von Penicillin auf die Bewegung der *Fasciola hepatica*-Würmer wurde von D. Tesić und L. Mihajlovic untersucht: sie konnten bei ihren Versuchen keinen Einfluß des Penicillins auf die Muskelkontraktionen der *Fasciola hepatica* feststellen (44).

Über Streptomycin liegen keine derartigen Untersuchungen vor.

Als Hinweis auf den fehlenden Einfluß von Penicillin und Streptomycin auf Motilität und Sterblichkeit der *Fasciola hepatica* dienten die vorangehenden Vergleichsversuche zwischen Medium mit und ohne Zugabe der beiden Antibiotika. Bei einer Vergleichszahl von je 20 unkontaminierten *Fasciola hepatica* konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Motilität oder Sterblichkeit festgestellt werden.

Der Ausfall durch Kontamination lag in den Versuchen ohne Verwendung von Penicillin/Streptomycin bei über 40 % in einem Beobachtungszeitraum von 30 Tagen. Bei Verwendung von Antibiotika gab es keinen Ausfall durch Kontamination.

Nachdem bei diesen Vorversuchen kein Einfluß auf Motilität und Absterberate erkennbar waren, wurde in den folgenden Versuchen Penicillin/Streptomycin regelmäßig zugesetzt.

5.1.4 Lösungsmittel

Die Löslichkeit der geprüften Medikamente in Wasser und in den Medien war nicht ausreichend, um die notwendigen Konzentrationsreihen herzustellen. Daher wurde Äthanol als Lösungsmittel für die Medikamente der Versuche verwendet.

Die Vorversuche zeigten keinen signifikanten Einfluß des Äthanol auf Motilität und Absterberate der *Fasciola hepatica*.

Der Einfluß des Äthanol auf die Medikamentenwirkung wurde nicht untersucht.

5.1.5 Beobachtungsmethoden

a) Bestimmung der Eiausscheidung

Bei Verwendung des Mediums M199 waren bereits am 2. Tag nur noch geringe Mengen *Fasciola hepatica* Eier im Gefäß zu finden. Für genauere Aussagen müßten stündliche Untersuchungen durchgeführt werden, die mit der hier verwendeten Methodik nicht möglich waren.

Es wurden mehrfach in der Literatur dokumentierte Versuche durchgeführt, die Qualität von Medien in bezug auf *Fasciola hepatica* durch Messung der in vitro-Eiausscheidung zu bestimmen. Für Medien mit definierten Bestandteilen sind dabei bisher keine zufriedenstellende Ergebnisse erzielt worden:

Die Eiausscheidung dauerte nur noch wenige Stunden nach Entnahme der *Fasciola hepatica* an. (15) (24)

Es wird vermutet, daß in der Kultur nur noch die in vivo produzierten Eier aus dem Uterus freigegeben und keine neuen Eier mehr in vitro produziert werden (36).

Die Zählung der ausgeschiedenen Eier wurde daher in der vorliegenden Studie nicht zur Beobachtung der Wirkung der zu untersuchenden Fasziozide herangezogen.

b) Motilität

Der Wert einer Einteilung der Motilität in mehrere Stufen zur Quantifizierung der Wirkung von Faszioziden wird erheblich vermindert durch subjektive Einflußgrößen und durch zeitliche Schwankungen der Motilität von *Fasciola hepatica*.

Fairweather et al (17) haben Amplitude und Frequenz der Beweglichkeit von *Fasciola hepatica* untersucht und zeitliche Schwankungen nachgewiesen. Aufgrund dieser zeitlichen Schwankungen könnte nur durch eine kontinuierliche Aufzeichnung der Motilität mit entsprechender Apparatur eine Quantifizierung der Wirkung der Medikamente auf die Motilität der *Fasciola hepatica* erreicht werden.

Die Apparatur von Fairweather et al, bestehend aus Elektrode, Vorverstärker und einem Hochgeschwindigkeits-schreiber, ist zu aufwendig, um damit eine große Zahl an *Fasciola hepatica*, wie in der vorliegenden Studie, auf ihre Motilität zu untersuchen. Zudem werden bei Fairweather et al die Elektroden direkt an den *Fasciola hepatica* befestigt. Der Einfluß dieses Eingriffes auf das Verhalten der Leberegel ist unklar.

Die hier verwendete Beobachtungsmethode unterliegt subjektiven Schwankungen, wurde aber wegen dem geringen zeitlichen und methodischen Aufwand zur Bestimmung des Medikamenteneinflusses auf Motilität und Absterberate der *Fasciola hepatica* beibehalten.

c) Einteilung in lebend oder tot

Bei der Stufe "0" der Motilitätsbeurteilung traten bei längerer Beobachtung (mehr als 1 Minute) und 40facher Vergrößerung gelegentlich noch minimale Bewegungen auf, so daß möglicherweise nicht alle Leberegel zu diesem Zeitpunkt vollständig abgestorben waren.

Ein exakter Nachweis des Absterbezeitpunkts wäre nur durch biochemische oder elektrophysiologische Untersuchungen möglich.

Da nach Erreichen der Motilitätsstufe "0" bei weiterer Inkubation in Medikamenten-freiem Medium keine Reversibilität der Beweglichkeit gefunden werden konnte, ist die Schädigung auch noch nicht vollständig abgestorbener Egel offensichtlich so stark, daß keine Erholung mehr möglich ist.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde vereinfachend die Beweglichkeitsstufe "0" mit "abgestorben" gleichgesetzt und somit die Beurteilung der Medikamentenwirkung auf die Beobachtung der Motilität beschränkt.

5.1.6 Medikamente

Praziquantel unterliegt in der Leber einer ausgeprägten "first-pass"-Metabolisierung (29). Die dabei entstehenden Metaboliten könnten einen wesentlichen Teil an einer Wirkung auf *Fasciola hepatica* beim Menschen haben.

Die Wirkung von Praziquantelmetaboliten auf *Fasciola hepatica* und andere Helminthen ist bislang nicht untersucht. Sie standen zu einer Untersuchung nicht zur Verfügung. Die Wirkung von Praziquantel auf alle sonstigen Trematoden beruht allerdings auf der unveränderten Substanz und nicht auf den Metaboliten; die Wirksamkeit ist daher in vivo wie in vitro vergleichbar (6).

Innerhalb des gesetzten Beobachtungszeitraumes von 10 Tagen zeigte Praziquantel keinen faszioliziden Effekt. Sämtliche in verschiedenen Konzentrationen von Praziquantel inkubierten *Fasciola hepatica* ($n = 20$) starben nach mehr als 10 Tagen, d.h. in einem Zeitraum, indem das verwendete Medium keine sicher verwertbare Aussage über die Medikamentenwirkung zuließ, da hier bereits in der Kontrollgruppe, d.h. ohne Zugabe eines Medikamentes, die Motilität ab- und die Letalität zunahm.

Dagegen fiel die Motilität der *Fasciola hepatica* bei Inkubation in Praziquantel rasch ab. Am deutlichsten ausgeprägt war dieser Effekt bei den Konzentrationen 50 mg/l und 100 mg/l Praziquantel.

Praziquantel besitzt demnach keine fasziolizide Wirkung *in vitro*, hemmt aber abhängig von der Konzentration die Motilität.

Zugabe von 10 % Humanserum verzögerte die Wirkung auf die Motilität der *Fasciola hepatica* um mehrere Tage. Offensichtlich liegt eine Bindung des Praziquantels mit Bestandteilen des Serums vor, die die motilitätshemmende Wirkung des Praziquantels vermindern.

Bei Triclabendazol konnten auch die beiden Metaboliten Sufoxid und Sulphon geprüft werden, nicht aber die bei *in vivo*-Versuchen nachgewiesenen hydroxylierten Produkte OH-Triclabendazol, OH-Sulfoxid und OH-Sulphon (25).

Triclabendazol und seine beiden Metaboliten Sulphon und Sulfoxid wirkten alle drei gleich gut auf *Fasciola hepatica* und führten bei einer Konzentration von jeweils 30 mg/l nach maximal 30 Stunden zum Absterben sämtlicher *Fasciola hepatica*.

Die fasziolizide Wirkung setzt deutlich später ein als bei Niclofolan und Niclosamid.

Zugabe von 60 g/l Albumin zum Medium M199 verzögerte die Wirkung des Triclabendazols und seiner Metaboliten beträchtlich:

bis zum Absterben sämtlicher *Fasciola hepatica* verging die 5 - 9fache Zeit.

Offensichtlich lag eine Bindung des Triclabendazols sowie seiner Metaboliten an das Albumin vor, die zu der beobachteten Verminderung der faszioliziden Wirkung führte.

In vivo-Untersuchungen mit Bestimmung der Konzentration von Triclabendazol in der Gallenflüssigkeit liegen nicht vor. Es ist daher nicht bekannt, ob eine Konzentration von 30 mg/l in der Galle erreicht werden kann.

5.2 Vergleich mit anderen Untersuchungen

5.2.1 Methodik

Ben Dawes (16) und Wikerhauser/Cvetnik (47) erreichten mit dem Hedon Fleigh-Medium Überlebenszeiten der *Fasciola hepatica* *in vitro* von 7 bis maximal 12 Tagen. Diese Ergebnisse liegen gering über den in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnissen mit Hedon Fleigh. Die längste beobachtete Überlebenszeit in dieser Studie bei Verwendung des Mediums HF betrug 8 Tage.

In der Literatur finden sich nur für Medien mit undefinierten Bestandteilen längere Überlebenszeiten als in der vorliegenden Studie bei Verwendung von M199:

Benex (7) berichtete von einer Überlebenszeit bis zu 50 Tagen, bei Verwendung von Hank's Balanced Salt Solution mit 3 % Glucose, 20 % Fohlenserum und 0,05 % Schäferythrocyten. Foster (20) erreichte eine Überlebenszeit von 16 Tagen mit Earle's Salzen bei Zugabe von Hefeextrakt und Verwendung einer Temperatur von 28°C. Der Wert dieser Methode scheint eingeschränkt aufgrund der unphysiologisch niedrigen Temperatur und dem damit voraussichtlich verminderten Stoffwechsel der *Fasciola hepatica*.

Eine Lebensverlängerung von *Fasciola hepatica* ließe sich eventuell noch durch ein "continuous-flow"-System erreichen, wie es von Lehner und Sewell beschrieben wurde (28). Die genannten Autoren konnten damit eine signifikante Lebensverlängerung bei Verwendung verschiedener Medien erzielen.

5.2.2

Medikamentenwirkung

Notteghem et al (33) erhielten mit Niclofolan in der Konzentration von 1 mg/l das gleiche Ergebnis wie die vorliegende Studie:

Absterben aller untersuchten *Fasciola hepatica* innerhalb von 24 Stunden.

In der gleichen Untersuchung starben bei Verwendung von 0,1 mg/l Niclosamid alle *Fasciola hepatica* nach 24 Stunden, während in der hier vorliegenden Studie erst nach 42 Stunden sämtliche *Fasciola hepatica* starben. Dieser Unterschied erklärt sich wahrscheinlich durch die unterschiedliche Kulturmethodik der beiden Studien.

Fairweather et al (18) haben 1983 mit Hilfe einer Meßapparatur verschiedene Faszioлизide in ihrer Wirkung auf die Motilität von *Fasciola hepatica* getestet. Mit Praziquantel in der Konzentration von 100 mg/l wurde dabei eine Motilitätseinschränkung nach über 24 Stunden festgestellt. Dies entspricht den hier vorliegenden Ergebnissen.

Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop konnten bei 60minütiger Inkubation mit 100 mg/l Praziquantel keine morphologischen Veränderungen am Tegument der *Fasciola hepatica* nachweisen, die sonst bei allen Untersuchungen an anderen Trematoden erkennbar waren (6).

In einer prospektiven Studie bei 34 Patienten mit Fasciolose führte Praziquantel in einer Dosierung von 75 - 125 mg/kg täglich über 1 - 5 Tage in 21 % der Fälle zum Sistieren der Eiausscheidung (27).

Andere Therapieversuche führten durch hohe und langfristige Dosierung von Praziquantel (75 mg/kg/Tag über 8 Tage) zur Heilung der Fasciolose bei 2 Patienten mit völligem Sistieren der Eiausscheidung und Normalisierung humoraler Parameter (32).

Bei Schafen und Rindern blieb die Wirkung des Praziquantels unzufriedenstellend (Dr. P. Andrews, Bayer AG, persönliche Mitteilung). Gabe von Praziquantel in hoher Dosierung über mehrere Tage, wie beim Menschen, wurde tierexperimentell nicht versucht.

Andere Untersucher haben eine letale Wirkung des Praziquantels auf *Fasciola hepatica* in vitro bei einer Dosierung von 300 mg/l festgestellt (21).

Bei Versuchen an freiwilligen Probanden wurde allerdings selbst bei Gabe von hohen Dosen wie 1 x 50 mg/kg und bei Gabe von 3 x 25 mg/kg/Tag Praziquantel im Blut eine Konzentration von 2 mg/l nicht überschritten (30). Bei Versuchen am Hund wurde eine Plasmakonzentration von maximal 4,6 mg/l und eine Gallenflüssigkeitskonzentration von maximal 13 mg/l nach Gabe der hohen Dosis von 100 mg/kg bestimmt (3). Untersuchungen mit C_{14} markiertem Praziquantel haben gezeigt, daß ca. 80 % der an Ratten, Hunden und Rhesusaffen verabreichten Radioaktivität, entsprechend 80 % Praziquantels und seiner Metaboliten, innerhalb von 24 Stunden aus dem Körper ausgeschieden werden (3). Somit kann auch eine wiederholte Gabe des Medikamentes über mehrere Tage nicht zu wesentlich höheren Plasma- oder Gallensaftkonzentrationen führen.

Eine Konzentration von 100 mg/l, wie in der vorliegenden Studie, liegt damit weit über den in vivo erreichbaren Serum- und Gallenkonzentrationen und müßte ausreichend für eine Beurteilung der faszioliziden Wirkung der Reinsubstanz sein.

Eine Konzentration von 300 mg/l, wie von Andrews verwendet, liegt weit über den in vivo erreichbaren Werten.

R.J. Richards (Ciba Geigy, persönliche Mitteilung) fand eine bessere Wirkung des Sulfoxid-Metaboliten von Triclabendazol gegenüber der Ausgangssubstanz Triclabendazol. Zusatz von Albumin verstärkte gering die Wirkung des Sulfoxid-Metaboliten bei dem gleichen Untersucher. Dies wurde allerdings nur bei Kurzinkubation beobachtet (d.h. weniger als 48 Stunden). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen das Gegenteil und wurden mehrfach überprüft.

In vivo-Untersuchungen mit Triclabendazol gegen *Fasciola hepatica*-Infektionen lagen zur Zeit dieser Studie nur für die Tier-Fasziolose vor.

Smeal und Hall (42) erreichten bei infizierten Schafen in 99 % die Elimination von unreifen und adulten Leberegeln bei einer verabreichten Dosis von 10 mg/kg Triclabendazol. Ähnlich gute Ergebnisse erreichten Turner et al 1984 mit 51 infizierten Schafen:

6 und 12 Wochen alte *Fasciola hepatica* sprachen zu 99 % auf 5 mg/kg an,

4 Wochen alte *Fasciola hepatica* sprachen zu 100 % auf 10 mg/kg Triclabendazol an und

bei 2 Wochen alten *Fasciola hepatica* hatte Praziquantel in den Konzentrationen 10 mg/kg und 12,5 mg/kg auf 93-94 % der Würmer eine letale Wirkung.

Der bei Schafen und Ziegen gemessene Blutspiegel von radioaktiv markiertem Triclabendazol bei einer Dosis von 10 mg/kg hatte ein Maximum von 15 mg/l nach 24 - 36 Stunden (14). Die gemessenen Blutspiegel liegen somit im Bereich der in der vorliegenden Studie verwendeten Konzentrationen.

Über Konzentrationen von Triclabendazol und seinen Metaboliten im Gallensaft beim Menschen liegen derzeit noch keine Untersuchungen vor. Ihre Bestimmung wäre für weiterführende Untersuchungen und Vergleiche mit den in vitro Ergebnissen wünschenswert.

5.3

Schlußfolgerungen

- a) Bei Kultivierung von *Fasciola hepatica* Adultwürmern in Medium M199 wurde eine Lebenszeit zwischen 10 und 29 Tagen erreicht.
- b) Bei Verwendung von Hedon-Fleish-Medium lag die Überlebenszeit der *Fasciola hepatica* zwischen 4 und 8 Tagen.
- c) Zugabe von 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin und von 2 ml/l Äthanol als Lösungsvermittler für die zu prüfenden Fasciolizide hatte keinen Einfluß auf die Überlebenszeit der *Fasciola hepatica*.
- d) Niclofolan und Niclosamid zeigten in allen untersuchten Konzentrationen (Niclofolan 1 - 2 mg/l, Niclosamid 0,1 - 1 mg/l) eine fasziolizide Wirkung in vitro. Sämtliche *Fasciola hepatica* waren bei Inkubation in 1 mg/l Niclofolan nach 24 Stunden, bei Inkubation in 0,1 mg/l Niclosamid nach 42 Stunden abgestorben.
- e) Praziquantel hemmt konzentrationsabhängig (1 - 100 mg/l) die Motilität von *Fasciola hepatica*-Adultwürmern in vitro. Diese Wirkung wird durch Zugabe von 10 % Human-Serum deutlich abgeschwächt. Praziquantel zeigte keine signifikante fasziolizide Wirkung in vitro.
- f) Triclabendazol und seine Metaboliten zeigten eine vergleichbare fasziolizide Wirkung auf *Fasciola hepatica* in vitro und verkürzten die Überlebenszeit konzentrationsabhängig. Zugabe von 60 g/l Albumin führte zu einer Abschwächung bzw. Verzögerung der Wirkung.

6. Zusammenfassung

Es wurde die Wirkung verschiedener Anthelmintika auf *Fasciola hepatica* Adultwürmer *in vitro* untersucht.

Die Überlebenszeit von *Fasciola hepatica* *in vitro* konnte durch Verwendung des Mediums M199 gegenüber Hedon-Fleish-Medium und anderen bisher angewandten definierten Medien wesentlich verlängert werden. Die Überlebenszeit lag zwischen 10 und 29 Tagen.

Durch Zugabe von 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin konnte die Kontaminationsrate gesenkt werden, ohne Motilität oder Überlebenszeit zu beeinflussen.

Die Zugabe von Äthanol als notwendiger Lösungsvermittler für die Medikamente hatte ebenfalls keinen Einfluß auf Motilität oder Überlebenszeit.

Die Verwendung zweier Referenzfasziolizide (Niclofolan und Niclosamid) mit bekannter *in vitro* Aktivität zeigte in allen untersuchten Konzentrationen (Niclofolan 1 - 2 mg/l, Niclosamid 0,1 - 1 mg/l) eine schnelle und vollständige fasziolizide Wirkung.

Praziquantel hemmte konzentrationsabhängig die Motilität von *Fasciola hepatica*, zeigte jedoch auch in hohen Konzentrationen (bis 100 mg/l) keine signifikante fasziolizide Wirkung.

Triclabendazol und seine Sulfoxid- und Sulphonmetaboliten zeigten eine vergleichbare fasziolizide Wirkung. Der Eintritt der Wirkung war konzentrationsabhängig, alle untersuchten Konzentrationen (Triclabendazol 3 - 60 mg/l, Sulfoxid- und Sulphonmetabolit 3 - 30 mg/l) wirkten fasziolizid. Eiweißzugabe führte zu einer Abschwächung bzw. Verzögerung der Wirkung.

Ein Absterben sämtlicher Leberegel konnte nach folgenden Zeiten erreicht werden:

Triclabendazol	3 - 60 mg/l	nach	78 - 6 Std.
Sulfoxidmetabolit	3 - 30 mg/l	nach	90 - 30 Std.
Sulphonmetabolit	3 - 30 mg/l	nach	132 - 12 Std.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ambroise-Thomas, P.; Goullier, A.;
Biltricide Symposium on African Schistosomiasis
Nairobi, 24-26 Februar 1980
- 2 Ambroise-Thomas, P.; Wegner, D.H.G.; Goullier, A.;
Praziquantel in the Treatment of far eastern human liver fluke
Infections: 46 cases
Service de Parasitologie, Consultations de maladies parasitaires
Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble
B.P. 217x38043 Grenoble Cedex
- 3 Andrews, P.;
Pharmakokinetische Tieruntersuchungen mit Droncit^R unter
Verwendung einer biologischen Prüfmethode
Vet.Med.Rev., 10: 154 - 165 (1976)
- 4 Apajalahti, J.;
Tratamiento de infecciones por Diphyllbothrium latum con una
dosis oral unica de praziquantel
Bolchil. Parasit., 32 (1/2), 43 (1977)
- 5 Baranski, M.C.;
Tratamiento de teniasis e himenolepsis humanas con praziquantel
(Embay 8440)
Bol. chil. Parasit., 32 (1/2), 37-39 (1977)
- 6 Becker, B.; Mehlhorn, H.; Andrews, P.; Thomas, H.; Eckert, J.;
Light and Electron Microscopic Studies on the effect of Prazi-
quantel on Schistosoma mansoni, Dicrocoelium dendriticum and
Fasciola hepatica (Trematoda) in vitro
Parasitenkd. 63; 113 - 128 (1980)
- 7 Benex, J.;
Les possibilités de la culture organotypique en milieu liquide
dans l'étude des problèmes parasitaires. III. Le mantien en
survie in vitro de Fasciola hepatica et de Dicrocoelium
lanceolatum.
Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 59: 99-105 (1966)
- 8 Biltricide Symposium on African Schistosomiasis
Nairobi 24.-26. February 1980:
Arzneim.Forsch. 31: 535-618
- 9 Brink, G.; Schenone, H.; Diaz, V.; Parra, M.; Corrales, M.;
Neurocisticercosis. Tratamiento con praziquantel. Estudio
preliminar.
Boletin Chileno de Parasitologia 35 (3/4): 66-71 (1980)

- 10 Bühring, K.U.; Diekmann, H.W.; Müller, H.; Garbe, A.;
Nowak, H.;
Metabolism of Praziquantel in man
Europ. J. Drug Metabolism and Pharmacokinetics,
3: 179-190 (1978)
- 11 Bunnag, D.; Radomyos, P.; Harinasuta, T.;
Field trial on the treatment of fasciolopsiasis with
praziquantel
Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health
14 (2): 216-219 (1983)
- 12 Bylund, G.; Bang, B.; Wikgren, K.;
Evaluacion experimental del efecto de praziquantel contra
Diphyllbothrium latum in vivo e in vitro
Bolchil. Parasit., 32 (1/2): 7-10 (1977)
- 13 Chen Minggang, Fu Sui, Hua Xiangjin, Wu Huimin
A retrospective survey on side effects of praziquantel among
25693 cases of schistosomiasis japonica.
Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health
14 (4): 495-500 (1983)
- 14 Ciba-Geigy: Technical Data Sheet, Triclabendazol (INN)
- 15 Clegg, J.;
Studies on the maintenance in vitro of Fasciola hepatica
Ph. D. Thesis, University of London (1957)
- 16 Dawes, B.;
Maintenance in vitro of Fasciola hepatica
Nature, 174: 654-655 (1954)
- 17 Fairweather, I.; Holmes, S.D.; Threadgold, L.T.;
Fasciola hepatica: A Technique for Monitoring in Vitro
Motility
Exp. Parasitology 56: 369-380 (1983)
- 18 Fairweather, I.; Holmes, S.D.; Threadgold, L.T.;
Fasciola hepatica: Motility Response to Fasciolicides in Vitro
Exp. Parasitology 57: 209-224 (1984)
- 19 Farid, Z.; El-Masry, N.A.; Wallace, C.K.;
Treatment of Hymenolepsis nana with a single oral dose of
praziquantel
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and
Hygiene 78 (2): 280-281 (1984)
- 20 Foster, G.R.;
A Suggested Medium for Maintaining Fasciola Hepatica Prior to
in Vitro Experimentation
Z. Parasitenkd. 52: 129-150 (1977)

- 21 Gönner, R.; Andrews, P.;
Praziquantel, a New Broad-Spectrum Antischistosomal Agent
Z. Parasitenkd. 52: 129-150 (1977)
- 22 Groll, E.;
Tema parasitologico de actualidad
Panorama general del tratamiento de las infecciones
humanas por cestodos con praziquantel (Embay 8440)
Bol.chil. Parasit., 32 (1/2): 27-31 (1977)
- 23 Groll, E.;
Taeniasis - a disease which should be treated in:
Proceedings of the first International Symposium
on human taeniasis and cattle cysticercosis,
20-24 September 1982
České Budějovice, Czechoslovakia
- 24 Guevara-Pozo, D.;
Estudios sobre supervivencia in vitro de helmintos
parasitos.
I Curvas de ovoposición en Fasciola hepática.
Proceedings of the First International Congress of
Parasitology 1 (A2): 67 (1966)
- 25 Hennessy, D.;
Pharmacokinetic behaviour of CGA-89317 in the blood and
bile of sheep
Edited draft of PhD studies
- 26 Hiepe, Th.;
Lehrbuch der Parasitologie
Band 1: Allg. Parasitologie 1981/1
- 27 Knobloch, J.; Delgado, A.E.; Alvarez, G.A.; Reymann, U.;
Bialek, R.;
Human fascioliasis in Cajamarca / Peru
I. Diagnostic methods and treatment with Praziquantel
Trop.-Med. Parasit. 36: 88-90 (1985)
- 28 Lehner, R.P.; Sewell, M.M.H.;
Maintenance in vitro of Adult Fasciola hepatica in a
continuous Flow-System
Veterinary Parasitology, 5: 315-323 (1979)
- 29 Leopold, G.; Diekmann, H.; Nowak, H.; Patzschke, K.;
Pharmakokinetik von Praziquantel
Tropenmed. Parasit., 28 (2): 276 (1977)

- 30 Leopold, G.; Ungethüm, W.; Groll, E.; Diekmann, H.W.;
Nowak, H.; Wegner, D.H.G.;
Clinical Pharmacology in Normal Volunteers of Praziquantel,
a New Drug Against Schistosomes and Cestodes
Europ. J. clin. Pharmacol. 14: 281-291 (1978)
- 31 Löscher, Th.; Nothdurft, H.-D.; Prüfer, L.;
Sonnenburg, F. von; Lang, W.;
Praziquantel in Clonorchiasis and Opisthorchiasis
Tropenmed. Parasit. 32: 234-236 (1981)
- 32 Löscher, Th.;
Praziquantel bei Parasitosen
Münch. med. Wschr. 124 (32/33): 718 (1982)
- 33 Notteghem, M.-J.; Léger, N.; Cavier, R.;
Sur une méthode d'essai in vitro des anthelminthiques actifs
contre *Fasciola hepatica*
Annals pharmaceutiques francaises 32 (1): 53-58 (1974)
- 34 Patzschke, K.; Diekmann, H.W.;
Serum concentrations and renal excretion after oral
application of C-14-Praziquantel to volunteers.
Comparison between three determination methods.
Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics, 1978
- 35 Paz, G.;
Tratamiento de taeniasis saginata con praziquantel
(Embay 8440)
Bolchil. Parasit. 32 (1/2): 14-16 (1977)
- 36 Ractcliffe, L.H.; Guevara-Pozo, D.; Lopez-Roman, R.;
In vitro maintenance of *Fasciola hepatica*
A factorial approach based on egg-production
Exp. Parasitol. 26: 41-51 (1969)
- 37 Rim, H.J.; Chang, Y.-S.;
Chemotherapeutic effect of niclofolan and praziquantel in
the treatment of paragonimiasis
Korea Univ. Med. J. 17: 113-126 (1980)
- 38 Rim, H.-J.; Yoo, K.S.;
Chemotherapeutic effect of Praziquantel (Embay 8440)
in the Treatment of Clonorchiasis sinensis
Korea University Medical Journal 16 (3): (1979)
- 39 Rim, H.J.; Won, C.R.; Chu, J.W.;
Studies on human cysticerciasis and its therapeutic trial
with Praziquantel (Embay 8440)
Korea University Medical Journal 17 (3): 459-475 (1980)

- 40 Saif, M.; Abdel-Meguid, M.;
Observations on tolerance and efficacy of Biltricide in
Egyptian patients infected simultaneously with
S. haematobium and *S. mansoni*
Biltricide Symposium on African Schistosomiasis
Nairobi, 24-26 February 1980

- 41 Schenone, H.; Galdames, M.; Rivadenaira, A.; Morales, E.;
Hoffman, M.T.; Asalgado, N.; Meneses, G.; Mora, M.V.;
Cabrera, G.;
Tratamiento de las infecciones por *Hymenolepis nana* en
niños con una dosis oral única de praziquantel
(Embay 8440)
Bol.chil.Parasit. 32 (1/2): 11-13 (1977)

- 42 Smeal, M.G.; Hall, C.A.;
The activity of Triclabendazol against immature and adult
Fasciola hepatica infections in sheep
Australian Veterinary Journal 60 (11): 329-331 (1983)

- 43 Su Zhichana
Epilepsy caused by pyquiton (praziquantel) treatment in
a case of clonorchiasis,
J. Parasit. and Parasitic Diseases 1 (3): 192 (1983)

- 44 Tesič, D.; Mihajlovič, L.;
Proučanje dejstva lekova na *Fasciola hepatica* pompoču
Kimografa
Acta veterinaria 15: 121-128 (1965)

- 45 Turner, K.; Armour, J.; Richards, R.J.;
Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola*
hepatica in sheep
Veterinary Record 114 (2): 41-42 (1984)

- 46 Wahn, V.; Melhorn, H.;
Vier Parasitenarten bei einem achtjährigen Jungen
Dtsch.med.Wschr. 109: 1486-1488 (1984)

- 47 Wikerhauser, T.; Cvetnik, S.;
Survival of Young and Sexually Mature Adult *Fasciola*
hepatica in Various Cell-Free Media with and without
Mammalian Cell Cultures
Exp. Parasit. 20: 200-204 (1967)

- 48 Wolff, K.; Eckert, J.; Schneiter, G.; Lutz, H.;
Efficacy of Triclabendazol against *Fasciola hepatica* in
sheep and goats
Veterinary Parasit. 13: 145-150 (1983)

- 49 Zhu Daoyun, Xu Wencheng
Effect of Biltricide on cysticercosis cellulosae with
muscular pseudohypertrophy. A report of three cases.
J. Parasit. and Parasitic Diseases 1 (3): 185-186 (1983)

LEBENS LAUF

Am 19.09.1960 wurde ich in Hofheim/Taunus als Kind der Eheleute Dr.Hanns Joachim Grunewald und Margot Grunewald,geb.Michel,geboren.

Das Abitur schloß ich an der Gymnasialen Oberstufe Schwalbach 1979 ab und begann das vorklinische Medizinstudium an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz 1980.

Von 1982 an führte ich die klinischen Studien an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort.

Mein praktisches Jahr habe ich an Krankenhäusern der University of London absolviert.

Im Mai 1986 Erlangung der Approbation.

Von 1984 bis 1986 arbeitete ich an der vorliegenden Inaugural-Dissertation am Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie in München.

